

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO PARANÁ

JULIANE FAGOTTI

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA RESTRIÇÃO CRÔNICA DE SONO TOTAL EM MODELO
ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS

CURITIBA
2016

JULIANE FAGOTTI

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA RESTRIÇÃO CRÔNICA DE SONO TOTAL EM MODELO
ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Fisiologia, no
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Marcelo de Meira Santos Lima
Coorientador: Fernando Mazzili Louzada

CURITIBA
2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Fagotti, Juliane

Efeitos comportamentais da restrição crônica de sono total em modelo animal de parkinsonismo induzido por rotenona em ratos./ Juliane Fagotti.
– Curitiba, 2016.

64 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Marcelo de Meira Santos Lima

Co-orientador: Fernando Mazzili Louzada

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Parkinson, Doença de. 2. Sono – Privação. 3. Rotenona. 4. Substância negra. 5. Ritmos circadianos. I. Título II. Lima, Marcelo de Meira Santos. III. Louzada, Fernando Mazzili. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.833



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **JULIANE FAGOTTI** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à Aprovação da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de fevereiro de 2016.

Professor Doutor Roberto Andreatini
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Anete Curte Ferraz
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

a todas as pessoas
brilhantes,
inspiradoras,
ou até mesmo enfadonhas,
que nos inspiram a fazer grandes coisas

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço ao Professor Marcelo, meu orientador, essencial no desenrolar de todo o trabalho. Seu comprometimento com a excelência é inspirador. Me sinto privilegiada em ter a oportunidade de receber seus valiosos ensinamentos e conselhos. Mais ainda, sou grata por seu papel substancial em todas as etapas que alcancei até o momento na pós-graduação. Tenho plena consciência que sem sua presença e atuação, meu caminho até e a partir daqui seriam completamente diferentes.

Sobretudo, agradeço àqueles que amo. Minha jornada até aqui teria sido impossível sem o apoio da minha família, que acredita piamente em meu potencial, o qual eu jamais tive confiança. Sem o suporte educacional que vocês me proporcionaram eu jamais chegaria a este ponto. Neste momento, principalmente, sou grata por demonstrarem sobremaneira o quão orgulhosos estão. Em especial, agradeço a minha mãe, por tudo, para quem eu sequer tenho palavras que expressem o quão importante é. A minha irmã Mariane, a qual, pelo simples fato de existir em minha vida, a torna mais aprazível. Ao meu pai, pela fé que deposita em mim. Cabe aqui também meu mais completo apreço para aquele que é agora minha família em Curitiba, Leo. Obrigada pela parceria, paciência, carinho e compreensão. Por todos os filmes não vistos, as festas suprimidas, os fins de semana e noites virtualmente sozinhos. Amo vocês.

Expresso também a gratificação por fazer parte do Laboratório de Neurofisiologia. Aos colegas mais experientes, Adriano, Ana, Laís, Paty, Mariana, Bruno e Glaucia, obrigada por todas as dúvidas sanadas, ensinamentos e orientações. Estendo a partir daqui também os agradecimentos a Luana, Jéssica, Fran, Flávia, Natália, Hely e Fábio. Obrigada a todos por terem tornado essa jornada muito mais divertida, os dias mais agradáveis e pelas novas amizades construídas.

Adriano, Laís, Ana e Mariana, obrigada pela ajuda nas cirurgias e coletas. Fran e Flávia, sem vocês essa empreitada teria sido impraticável. Obrigada pela companhia nas longas horas de privação, pela disponibilidade quando o cansaço vencia. Vocês foram muito importantes! Agradeço também ao Leonardo, que mesmo entrando no laboratório com o projeto já em andamento, foi muito prestativo. Compartilho com todos vocês essa conquista.

Aos professores do departamento de Fisiologia, obrigada pelo exemplo. Sua paixão e dedicação pelo ensino e pela ciência cativam e inspiram. Não posso deixar de agradecer dois professores em especial: ao professor Fernando Louzada e à professora Carolina.

Hely, Fábio, Rogério e Roberto, obrigada pela dedicação e disposição em suas funções.

A Debra, por me receber na Universidade de Surrey e me proporcionar um olhar diferente das possibilidades e responsabilidades da vida acadêmica.

Ao Daan, por sua contribuição inesperada, mas imprescindível, na análise dos resultados. Tenho a convicção de que os resultados encontrados nesse trabalho não teriam sido os mesmos sem sua ajuda.

Às amigas Josi e Gi. São tantos anos de amizade não saberia nem por onde começar. Deixo apenas meu carinho e reconhecimento da importância que têm em minha vida.

Às novas amigadas construídas em Curitiba: Elis, Gabriel, Birla, André, Yuri, Le, Pri, Rhavi, Naldo, Le, Rennan, Joel, Flávio e Jo. Obrigada por me receberem! A presença de vocês tornou esse período de transição muito fácil e agradável.

Aos demais familiares e à família do Leo, peço desculpas por não ter espaço para mencionar cada um individualmente, mas saibam que foram lembrados com carinho.

Finalmente, ao Digo, que foi tão importante em minha trajetória na graduação e agora novamente. Obrigada pelo vínculo à faculdade, pela amizade longínqua e pela inspiração acadêmica. Nesse momento especificamente, obrigada por todas as horas de desabafo e pela companhia inefável... Poder contar com você foi essencial. A você e ao Tim, obrigada por me acolherem, pelos cafés da manhã, pelos passeios e pelos chás!

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e da realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

when you make the finding yourself
- even if you're the last person on Earth too see the light –
you'll never forget it.

Carl Sagan

RESUMO

A Doença de Parkinson é caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta e a presença de corpúsculos de Lewy, e apresenta uma série de sintomas não-motores pré-clínicos, como o distúrbio do sono e alterações circadianas. O modelo animal de DP induzido por rotenona é uma das abordagens mais recentes para mimetizar a doença em ratos e já foi bem caracterizado em nosso laboratório. Diversos estudos mostram alterações neuroquímicas e neuropatológicas na via nigroestriatal após a administração de rotenona, além de alterações motoras no teste do campo aberto. Visando mimetizar uma condição clínica mais parecida com a da nossa sociedade atualmente, os protocolos de restrição crônica de sono surgem como um viés com maior aplicabilidade clínica, principalmente em um paradigma de Doença de Parkinson, onde se percebe a urgência em descobrir e estabelecer sintomas que possam permitir um diagnóstico precoce da doença. Desta forma, o objetivo do trabalho foi investigar os desdobramentos de um protocolo de restrição crônica de sono em um contexto de DP e seus efeitos comportamentais. Ratos wistar machos foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para infusão intranigral de rotenona. Dez dias após a lesão, deu-se início ao protocolo de restrição crônica por gentle handling durante 21 dias. Foram realizados testes cognitivos (Campo Aberto e Reconhecimento de Objetos) basais, durante e no último dia de restrição. Após o término do período de restrição, animais que foram submetidos a restrição crônica de sono permaneceram durante 15 dias em sono rebote, durante o qual também foram realizados testes cognitivos. Durante todo o experimento, a atividade motora dos animais foi mensurada continuamente através de actimetria. Observou-se que a restrição crônica de sono *per se* não apresentou prejuízos comportamentais significativos, entretanto, associada ao modelo de parkinsonismo, a restrição foi capaz de reverter o prejuízo motor causado pela administração de rotenona. Os resultados cognitivos mostram que a restrição não produz alterações significativas na exploração do objeto não-familiar; verificou-se uma atividade exploratória aumentada generalizada do grupo veículo em relação ao lesionado. Analisando os padrões de atividade motora dos animais na actimetria, foi possível constatar que a restrição de sono em um contexto de DP apresenta também um componente circadiano, onde os animais rotenona restrição apresentaram um atraso no início da atividade na fase escura. Essa alteração se revelou permanente, pois os animais que foram restritos não recuperaram seu padrão normal de atividade durante o período rebote.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; restrição crônica de sono; rotenona; substância negra pars compacta; ritmo circadiano.

ABSTRACT

Parkinson's Disease is characterized by dopaminergic degeneration within neurons in the substantia nigra pars compacta and for the presence of Lewy bodies. It presents a range of pre-clinical non-motor symptoms, such as sleep disorders and circadian changes. The animal model of rotenone-induced PD is one of the most recent approaches aiming to mimic the disease and has been well characterized in our laboratory. Several studies show neurochemical and neuropathological changes in the nigrostriatal pathway after administration of rotenone and motor changes in Open Field task. In order to model a more similar clinical condition of what occurs in our society nowadays, chronic sleep restriction protocol appear as a trend with greater clinical applicability, particularly in a Parkinson's disease paradigm, where one can realize the urgency to discover and establish symptoms that may allow an early diagnosis of the disease. Therefore, the objective of this investigation was look into the consequences of a chronic restriction of sleep protocol in the context of DP and its behavioral effects. Male Wistar rats underwent stereotaxic surgery for an intranigral infusion of rotenone. Ten days after the injury, we initiate the chronic restriction protocol by gentle handling for 21 days. Cognitive tests (Open Field and Object Recognition) were performed at baseline, during and at the last day of restriction. After the restriction period, animals that went into to chronic sleep restriction remained for 15 days in rebound sleep, where cognitive tests were also conducted. Throughout the experiment, the motor activity of the animals was measured continuously by actigraphy. It was observed that chronic sleep restriction *per se* had no significant behavioral impairments. However, associated with Parkinsonism model, the restriction counteracted the motor impairment caused by rotenone administration. The results show that restriction didn't lead to significant changes in exploration of unfamiliar object and that there was a generalized increased exploration activity in vehicle group compared with rotenone group. Analysing the patterns of motor activity in actigraphy, it was found that sleep restriction in a DP context also exhibits a circadian component, where rotenone restriction animals had a delay in the activity onset in the dark phase. Such amendment proved permanent, as the animals that were restricted didn't recovered their normal pattern of activity during the rebound period.

Key-words: Parkinson Disease; chronic sleep restriction; rotenone; substantia nigra pars compacta; circadian rhythm.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT– 5-hidroxitriptamina (serotonina)

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

CT – Controle

DA – Dopamina

DP – Doença de Parkinson

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

ORT – Object Recognition Task (Teste de Reconhecimento de Objetos)

RBD – Distúrbios comportamentais do sono REM

REB – Rebote

REM – Rapid eye movement (Movimentos oculares rápidos)

ROT – Rotenona lesão

SCN – Núcleo supraquiasmático

SD – Restrição crônica de sono

SNpc – Substância negra pars compacta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	14
1.1.1	Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	14
1.1.2	Etiologia da Doença de Parkinson	15
1.1.2.1	<i>Fatores ambientais</i>	<i>15</i>
1.1.2.1.1	<i>Modelo animal de parkinsonismo induzido por Rotenona</i>	<i>17</i>
1.2	DISTÚRBIOS MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON	18
1.3	DISTÚRBIOS NÃO-MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON	18
1.3.1	Distúrbios de Sono na Doença de Parkinson.....	20
1.3.2	Sono e Ritmo Circadiano	21
1.3.3	Alterações de ritmo circadiano na Doença de Parkinson.....	22
1.3.4	Sono e Memória na Doença de Parkinson	23
1.4	PRIVAÇÃO DE SONO	24
1.4.1	Privação de Sono por Gentle Handling.....	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	ANIMAIS	29
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	30
4.4	PRIVAÇÃO CRÔNICA DE SONO	30
4.5	TESTE DO CAMPO ABERTO.....	31
4.6	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	31
4.7	ACTIMETRIA.....	32

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	33
5.1	CAMPO ABERTO	33
5.2	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	35
5.3	ACTIMETRIA.....	39
6	DISCUSSÃO	42
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXOS	58
	ANEXO I - ACTOGRAMAS	58
	ANEXO II - MODELO DO PERFIL DIÁRIO DE ATIVIDADE	64
	ANEXO III – TABELA DE VALORES DE ATIVIDADE.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente, atingindo cerca de 1% das pessoas acima de 65 anos e, acima dos 85 anos, a incidência sobe para 4 a 5% (Lang & Lozano, 1998). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a expectativa de vida tem crescido significativamente no Brasil (1970: 58,9 anos; 1980: 62,8 anos; 1990: 66,6 anos; 2011: 74,3 anos), e, conseqüentemente, doenças associadas ao envelhecimento têm se tornado assunto de grande importância na área da saúde. De fato, já se registra uma incidência de 5,3% da população brasileira com doenças neurodegenerativas (Kalaria et al., 2008). Estimativas consideram que a ocorrência dessas doenças irá dobrar nas próximas duas décadas em áreas mais populosas, de forma que esse tema se estabelece como primordial para diversos países, levando à necessidade de investimentos em prevenção e tratamento já no início da doença (Sharma et al., 2013).

1.1.1 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

A DP é marcada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc), evidenciada macroscopicamente pela despigmentação da porção ventrolateral dessa estrutura (Ickenstein, Klotz, & Langohr, 1999; Lane & Dunnett, 2008; Lang & Lozano, 1998). Essa característica se dá pela perda da aferência dopaminérgica da SNpc no estriado dorsal (caudado/putâmen), o que leva à redução da neurotransmissão dopaminérgica, refletindo em menor capacidade de liberação de dopamina (DA), assim como dos níveis estriatais de seus principais metabólitos, como o ácido homovanílico e ácido 3,4-dihidroxifenilacético, e, portanto, provocando a diminuição de atividade na via direta do circuito dos núcleos da base (mediada por receptores D1) e aumento na via indireta (receptores D2) (Kandel et al, 2003, (Lane & Dunnett, 2008; Lang & Lozano, 1998). Outra característica do parkinsonismo¹ é a presença de corpúsculos de Lewy no Sistema Nervoso

¹ O termo parkinsonismo refere-se a uma condição mais ampla que contempla distúrbios semelhantes à DP como a paralisar supranuclear, degeneração corticobasal, demência de corpos de Lewy, acidentes vasculares

Central, Periférico e Autonômico (Gasser, Hardy, & Mizuno, 2011; Jellinger, 2012); esses corpúsculos são inclusões intracitoplasmáticas de caráter eosinofílico cuja composição inclui agregados proteicos como α -sinucleína, ubiquitina, parkina e neurofilamentos. Entretanto, seus mecanismos de formação, sua importância na patogênese e função na neurodegeneração da DP ainda não estão totalmente elucidados (Del Tredici & Braak, 2012; Lang & Lozano, 1998).

1.1.2 Etiologia da Doença de Parkinson

Embora as características fisiopatológicas da doença já sejam bem caracterizadas, a etiologia e os mecanismos que levam à neurodegeneração dopaminérgica ainda não são completamente conhecidos. Recentemente, propõe-se que o início da agregação de α -sinucleína ocorre no bulbo olfatório e/ou no sistema nervoso entérico, locais potencialmente expostos a fatores hostis. Uma vez depois de formados, esses agregados parecem ser capazes de se propagar transinapticamente, em um processo virtualmente autopromotor, através de vias específicas (Del Tredici & Braak, 2015).

Evidências sugerem que a grande maioria dos casos seja decorrente da interação de fatores ambientais e disposição genética (Subramaniam & Chesselet, 2013), entretanto, outros fatores também poderiam contribuir para a neurodegeneração dopaminérgica na DP. Até o momento acredita-se num caráter multifatorial como sendo a condição deflagradora da doença, sendo, portanto, difícil atribuir valores ou proporções para cada um desses agentes etiológicos.

1.1.2.1 Fatores ambientais

O envolvimento de toxinas ambientais na patogênese da DP tem sido muito investigado. Especialmente após a descoberta que a administração da substância 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) leva ao aparecimento de sintomas parkinsonianos pela

encefálicos mesencefálicos, etc. Porém sempre com características clínicas semelhantes, como a presença de bradicinesia.

neurodegeneração nigroestriatal (Langston & Ballard, 1983). Desde então toxinas tem sido utilizadas sistematicamente para mimetizar a DP em modelos animais. Também tem sido observado que a exposição ocupacional crônica a metais pesados, como chumbo, manganês e cobre, está relacionada ao aparecimento de sintomas típicos da DP (Elbaz & Tranchant, 2007; Gorell, Peterson, Rybicki, & Johnson, 2004). Do mesmo modo, diversos estudos epidemiológicos têm mostrado que a exposição a pesticidas, está relacionada com o aumento no risco para o desenvolvimento da doença (Gorell et al., 2004; Hancock et al., 2008; Priyadarshi, Khuder, Schaub, & Priyadarshi, 2001; Ritz & Yu, 2000).

Uma meta-análise com 16 estudos abordando diferentes fatores ambientais revelou que, destes, 14 sugeriram um aumento no risco para a ocorrência da doença em indivíduos que foram expostos a pesticidas (Priyadarshi et al., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo com 319 pacientes sendo observada uma correlação positiva entre a DP e exposições a praguicidas (Hancock et al., 2008). Os autores relataram que os organoclorados, organofosforados, ésteres/ácidos de clorofenoxi e a rotenona são os pesticidas mais relacionados com um aumento no risco para o aparecimento de parkinsonismo. Essa exposição ambiental também influencia no aumento da mortalidade dentro da DP, demonstrado pelo aumento no número de mortes de pacientes em áreas onde verificou-se maior utilização de pesticidas se comparado a locais onde não havia uso dessas substâncias (Ritz & Yu, 2000).

A maior parte do conhecimento relativo à patogênese da DP provém de estudos realizados em modelos animais da doença, principalmente aqueles produzidos por neurotoxinas. Embora uma grande gama de moléculas sintéticas e naturais produzam efeitos deletérios em neurônios dopaminérgicos, apenas algumas são úteis em modelos animais vivos para mimetizar as características fundamentais da DP (Bove, Prou, Perier, & Przedborski, 2005).

A administração crônica do herbicida rotenona, em ratos, gera neurodegeneração dopaminérgica nigroestriatal associado a comportamentos parkinsonianos, como hipocinesia e rigidez (Betarbet et al., 2000), dessa forma, demonstrando que a inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, promovida por essa substância, assim como por outras neurotoxinas, pode contribuir para a patogênese da DP. Entretanto, as chances da rotenona ser a principal causa da DP são baixas, pois esse herbicida apresenta baixa

biodisponibilidade por via oral e rápida degradação no meio ambiente (Sherer, Betarbet, & Greenamyre, 2002).

1.1.2.1.1 Modelo animal de parkinsonismo induzido por Rotenona

O modelo animal de DP induzido por rotenona é uma das abordagens mais recentes para mimetizar a doença em ratos (Betarbet et al., 2000) e já foi bem caracterizado em nosso laboratório (Dos Santos et al., 2013; Moreira et al., 2012). A toxina produz uma redução de aproximadamente 60% dos neurônios Tirosina Hidroxilase-imunorreativos na SNpc, assim como, a longo prazo, verifica-se a depleção de DA – assim como aumento na sua recaptação e metabolização – e de seus metabólitos 30 dias após a administração da droga (Dos Santos et al., 2013; Nosedá et al., 2014; Proença et al., 2014; Rodrigues et al., 2014). Fisiopatologicamente, a administração bilateral de rotenona da SNpc como um modelo de DP corresponde à fase inicial da doença, com uma neurodegeneração tempo-dependente associada a alterações neuroquímicas, histológicas e cognitivas similares à da DP (Moreira et al., 2012).

A rotenona é uma toxina mitocondrial que atravessa livremente as membranas celulares, se acumulando em organelas como as mitocôndrias, onde prejudica a fosforilação oxidativa ao inibir o complexo I da cadeia de transporte de elétrons (Schuler & Casida, 2001). Estudos que levaram em consideração a extensão das lesões induzidas por essa toxina mostraram que sua infusão por diversas vias levava a uma neurodegeneração dopaminérgica nigroestriatal, com diferentes graus de severidade (Betarbet et al., 2000; Hoglinger et al., 2003; Sherer et al., 2002). Essa variação de suscetibilidade entre os indivíduos representa uma característica importante do modelo, pois este pode representar um panorama de investigação que leva em consideração as características genéticas de cada indivíduo bem como suas interações ambientais na hipótese da patogênese da DP (Perier, Bove, Vila, & Przedborski, 2003). Da mesma maneira, esse modelo produz prejuízos no dobramento de proteínas no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais remanescentes à lesão. Tais erros conformacionais acabam por gerar inclusões proteicas, comparáveis aos corpos de Lewy característicos da doença em humanos (Betarbet et al., 2000; Hoglinger et al., 2003; Sherer et al., 2003). Esse aspecto é considerado uma vantagem

em relação aos demais modelos induzidos por neurotoxinas (p.e. induzido por 6-hidroxidopamina), haja vista que ele possui validade preditiva.

No contexto comportamental, animais submetidos à rotenona apresentam mobilidade reduzida, postura fletida e até mesmo rigidez e catalepsia (Alam & Schmidt, 2002; Sherer et al., 2003). Prejuízos cognitivos também foram relatados após a administração intranigral dessa neurotoxina (Dos Santos et al., 2013).

1.2 DISTÚRBIOS MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON

Clinicamente, os sinais mais proeminentes do parkinsonismo são distúrbios motores hipocinéticos progressivos, que incluem redução dos movimentos voluntários, acinesia, bradicinesia, aumento do tônus muscular, tremor de repouso característico, alteração da marcha, postura fletida dorso-ventralmente e instabilidade postural (Kandel et al, 2003). Contudo, ocorre uma destruição da ordem de 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc antes que os sinais clínicos se tornem óbvios (Fahn, 2003; Iranzo, 2013), pois se desenvolvem lentamente e por vezes são intermitentes no início da DP (Sharma et al., 2013).

A dopamina tem um papel bem estabelecido no comportamento motor, o qual pode ser observado em contextos fisiopatológicos que envolvem um desequilíbrio nos níveis dopaminérgicos, como a DP, uma vez que tanto em indivíduos acometidos pela doença como em modelos animais há uma série de prejuízos motores (Lima, Martins, et al., 2012; Lima, Reksidler, & Vital, 2009).

1.3 DISTÚRBIOS NÃO-MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON

Por ser uma doença progressiva crônica, a DP possui um período pré-clínico, onde o processo patológico já se iniciou, mas ainda não se percebem as manifestações motoras necessárias para o diagnóstico; esse período prodrômico é reconhecido por sinais não motores, os quais precedem os motores em vários anos e podem inclusive contribuir com a progressão da doença, como disfunção olfatória e autonômica, depressão, distúrbio comportamental de sono dos movimentos oculares rápidos (REM) (RBD – REM *Sleep*

Behavior Disorder), sonolência diurna excessiva e insônia (Chaudhuri & Schapira, 2009; Lima, Martins, et al., 2012; Lima et al., 2009). Embora já esteja bem estabelecido que a degeneração nigroestriatal e o balanço entre as vias direta e indireta sejam responsáveis pela maioria dos sinais motores, os não motores, que podem ser igualmente debilitantes para os pacientes, ainda não estão claros em relação aos mecanismos que os originam (Póstuma et al, 2010; Sharma et al, 2013; Antonelli and Strafella, 2014). Estudos neuropatológicos dão suporte à associação destes distúrbios precoces com a DP, a partir da identificação de corpúsculos de Lewy em núcleos não dopaminérgicos em estágios de Braak pré-clínicos, antes de uma degeneração nigral significativa (Figura 1) (Del Tredici & Braak, 2012).

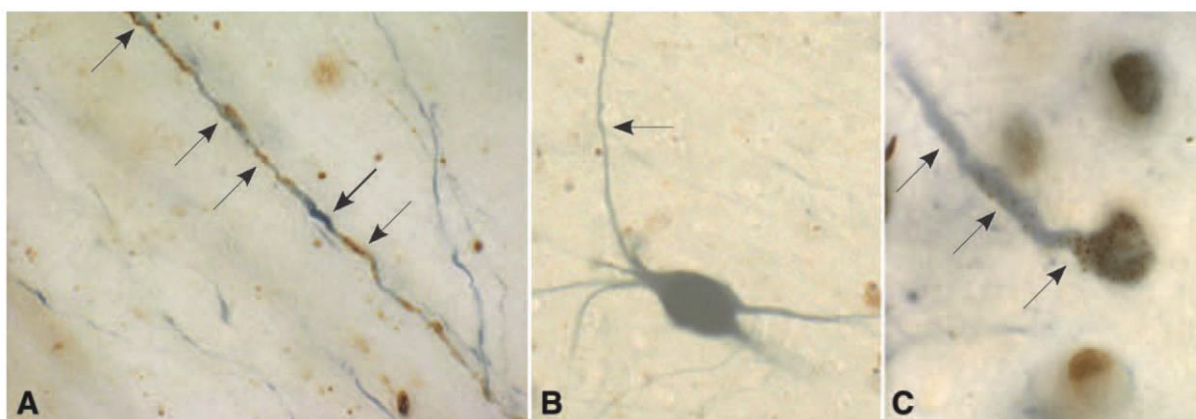


Figura 1. Imunohistoquímica de inclusões intraneuronais, denominadas corpos de Lewy, em neurônios não-dopaminérgicos. (A) As flechas finas indicam neuritos contendo corpúsculos de Lewy (em marrom) em um segmento de axônio pouco imunorreativo para Tirosina Hidroxilase (a flecha espessa mostra uma região altamente imunorreativa), no trato catecolaminérgico localizado no pedúnculo cerebelar superior. As figuras (B) e (C) mostram projeções neuronais TH-imunorreativas no locus coeruleus. A figura B mostra uma célula saudável e a figura C uma célula patológica, com presença de agregados particulados de α -sinucleína. Adaptado de Del Tredici and Braak, 2012.

Esse processo neurodegenerativo pode acometer diferentes áreas do cérebro, incluindo núcleos envolvidos na regulação circadiana e do sono. Não surpreende, portanto, que a doença implique em um colapso progressivo dos ciclos de vigília-sono, e dos padrões de sono e alerta (Videnovic, Lazar, Barker, & Overeem, 2014).

De fato, os distúrbios de sono são um fenômeno bem conhecido da DP, com etiologia complexa. Suas causas são multifatoriais, mas a degeneração patológica clássica se concentra em vias do tronco encefálico e talamocorticais, e, em um segundo panorama,

poderiam ser resultado de manifestações noturnas da doença ou do tratamento farmacológico (Lima, 2013). Entretanto, cada vez mais se evidencia que essas alterações são um efeito primário da DP na regulação sono, associado ao papel da dopamina modulando os estados de sono e vigília. O envolvimento dopaminérgico é evidenciado após a privação aguda de sono REM, a qual gera supersensibilidade dos receptores D2. A degeneração dopaminérgica na via nigrostriatal (conhecida por controlar e iniciar o planejamento motor) é primariamente associada à DP, mas pacientes com DP em que se verifica uma perda extensiva de células dopaminérgicas na SNpc normalmente apresentam maior sonolência (Lima, Andersen, et al., 2012)

De forma geral, essas alterações de sono são as mais impactantes das características não-motoras da DP, pois, além de afetarem negativamente a vida do paciente por si, contribuem com o agravamento de outros sinais cognitivos, como prejuízos de memória (Lima, 2013). Além disso, há evidência suficiente para endossar uma possível retroalimentação entre os distúrbios de sono e os prejuízos motores (Lima, Andersen, et al., 2012).

Nesse mesmo contexto, verifica-se o envolvimento de prejuízos circadianos na doença, que estariam intimamente ligados à desregulação dos padrões de sono e vigília. Nos últimos anos evidências tem endossado essas alterações circadianas na DP, que não apenas contribuem com a morbidade e diminuição da qualidade de vida, mas poderiam também impulsionar o processo degenerativo em si e contribuir com as manifestações autonômicas, cognitivas, psiquiátricas e motoras da doença (Bruguerolle & Simon, 2002; Videnovic, Lazar, et al., 2014). Esses transtornos circadianos podem se revelar como tendo um papel chave no desenrolar e no tratamento da doença, pois até mesmo o horário de medicação poderia ser um fator chave, influenciando as relações entre a função circadiana e o sono, assim como outras funções moduladas pelo sistema dopaminérgico (Videnovic, Lazar, et al., 2014).

1.3.1 Distúrbios de Sono na Doença de Parkinson

Os distúrbios de sono só foram relacionados à DP e outras doenças degenerativas há poucas décadas, embora James Parkinson já as tivesse citado em sua descrição inicial da doença (Lima et al., 2009b; Lima, 2013). Primariamente, esses distúrbios se referem à

insônia, movimentos anormais durante o sono (por exemplo, movimentos periódicos dos membros [*periodic limb movements*] e RBD) e sonolência diurna excessiva (De Cock et al, 2008). O RBD, por exemplo, tem um grande valor preditivo na DP, pois aproximadamente 50% dos indivíduos que a apresentam desenvolvem a patologia em 10 anos (Postuma et al, 2010), apesar de ainda se questionar sua sensibilidade de prognóstico, pois este não é identificado em todos os indivíduos com DP e a especificidade de seus sintomas ainda não foi totalmente estabelecida (Sharma et al, 2013). De fato, os mecanismos neurofisiológicos específicos dos distúrbios de sono estão longe de serem totalmente compreendidos e, apesar de aparentemente apresentarem um componente dopaminérgico, é difícil atribuir sua etiologia exclusivamente à neurodegeneração dopaminérgica, dada as variáveis envolvidas na DP, como os fatores emocionais, cognitivos, farmacológicos, etc (Lima et al, 2013).

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido aplicados para esclarecer o papel da DA em várias complicações decorrentes da depleção dopaminérgica na DP. Esses estudos evidenciam a habilidade multifuncional do sistema dopaminérgico, mas também se percebe que essas complicações dependem de outros fatores, como características fenotípicas individuais ou relacionadas a aspectos do processo patológico (Antonelli and Strafella, 2014). Para tanto, o desenvolvimento de modelos animais que permitam ampliar o conhecimento a respeito da fisiopatologia associada à DP, como os distúrbios de sono, é de extrema importância (Lima et al, 2013), pois quase todos os pacientes com DP apresentam algum destes distúrbios, os quais normalmente surgem precocemente no decorrer da doença (Nausieda et al, 1982; Lees et al, 1988; Tadberg et al, 1998).

1.3.2 Sono e Ritmo Circadiano

Por outro lado, em relação ao sono e à vigília, cada vez mais se identifica a participação dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e da área tegmental ventral (VTA). Proença et al. (2014) demonstraram que a privação aguda de sono REM leva a alterações na atividade neuronal e na liberação de DA no sistema nigroestriatal, assim como os níveis extracelulares de DA nas regiões terminais da Área Tegmental Ventral ao longo do ciclo vigília-sono também se alteram (Lena et al, 2005). Uma série de trabalhos clínicos e em

modelos animais tem apresentado a DA como sendo um neurotransmissor de caráter dual, portanto, estando relacionado não só com a vigília, mas também com a regulação dos processos de sono, em particular do sono REM (Lima et al. 2007b; Lima et al. 2007a; Lima et al. 2008b; Lima et al. 2008a; Santos et al. 2008; Lima et al. 2009b). Mais especificamente, esta relação é mediada pela ativação neuronal da SNpc (Lima et al, 2008a), tendo como componente chave os receptores D2 (Proença et al, 2014). A partir de tais estudos, tem-se sugerido que o sistema dopaminérgico nigroestriatal apresenta um papel chave para a regulação do sono, principalmente num contexto de neurodegeneração como no caso da DP (Lima et al, 2009b) e, mais ainda, alterações neste componente teriam efeitos diretos nas alterações cognitivas e de sono encontradas nos pacientes com a doença (Proença et al, 2014).

Alterações no sistema circadiano em modelos animais de DP ainda são pouco explorados (Chesselet & Richter, 2011; Taylor, Webb, Smith, Petzold, & Doyle, 2010). Entretanto, dada a grande influência do sistema circadiano na regulação de sono, e os evidentes prejuízos de sono observados na DP, mesmo que inúmeros mecanismos possam estar influenciando esses prejuízos, uma disfunção primária no sistema circadiano deve ser considerada como um fator contribuinte (Willison, Kudo, Loh, Kuljis, & Colwell, 2013).

1.3.3 Alterações de ritmo circadiano na Doença de Parkinson

Embora a doença de Parkinson (DP) seja considerada principalmente como uma desordem motora resultante da degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, existe evidência substancial de que uma vasta gama de sinais não-motores estão também presentes em todos os estágios de progressão da doença (Chaudhuri et al., 2006). Em particular, distúrbios do padrão diário do ciclo vigília/sono e vários ritmos fisiológicos são consistentemente documentados em pacientes com DP (Videnovic e Golombek, 2013). Tradicionalmente, os sinais motores são associados à disfunção dopaminérgica, enquanto se considerava que outros sinais precoces envolviam outros sistemas de neurotransmissão. Nos últimos anos esse ponto de vista tem sido remodelado, pois há evidência do envolvimento da DA em várias alterações não-motoras, assim como outras monoaminas foram associadas aos défices motores da doença.

A dopamina é um importante fator promotor da vigília (Ueno et al., 2012; Wisor et al., 2001) e, recentemente, mostrou-se que está intimamente ligada a funções do relógio circadiano. Quase todos os aspectos da transmissão dopaminérgica exibem ritmos diários de expressão (Castaneda, de Prado, Prieto, & Mora, 2004). Inversamente, a DA pode modular a expressão dos genes-relógio e a lesão do sistema nigroestriatal perturba os ritmos circadianos de sono-vigília e da expressão dos genes-relógio do estriado (Gravotta, Gavrila, Hood, & Amir, 2011).

Entretanto, sabe-se pouco ainda do papel do sistema circadiano na regulação do ciclo sono-vigília na DP. Já se demonstrou alterações nas flutuações diárias dos sinais clínicos e outros componentes fisiológicos, incluindo variações diurnas na atividade locomotora (Bonuccelli et al., 2000), perda do ritmo circadiano na frequência cardíaca (Pursiainen et al., 2002)), padrões de sono e alerta diurno prejudicados (Porter, Macfarlane, & Walker, 2008; Verbaan, van Rooden, Visser, Marinus, & van Hilten, 2008), além de flutuações nos níveis de dopamina circulante (Sowers & Vlachakis, 1984), cortisol (Hartmann, Veldhuis, Deuschle, Standhardt, & Heuser, 1997) e melatonina (Bordet et al., 2003).

1.3.4 Sono e Memória na Doença de Parkinson

Os processos de consolidação e retenção de memória declarativa, observada no teste de reconhecimento de objetos, sofrem um severo impacto com o bloqueio de receptores D2 ou com a privação de sono REM e percebe-se um efeito sinérgico nestes processos com a combinação de ambos (Proença et al., 2014). Contrariamente, a ativação dos receptores D2 neutraliza o prejuízo causado pela privação de sono paradoxal (Proença et al., 2014). Essa memória de reconhecimento baseada na familiaridade equivale à memória episódica em humanos, caracterizada pelo envolvimento do córtex perirrinal, a qual é enfraquecida nos estágios iniciais de DP (Souhay et al., 2006). Portanto, é razoável sugerir que a privação de sono paradoxal poderia potencializar o déficit de memória observado no início do desenvolvimento da DP, além de que a correlação entre os distúrbios de sono REM e danos cognitivos reforça a inclusão destes distúrbios como marcadores iniciais de neurodegeneração (Erro et al., 2012). Portanto, parece haver uma ligação intrínseca entre

sono e cognição sendo esta evidenciada num contexto de Parkinsonismo e/ou privação de sono, sugerindo uma influência notável do sistema dopaminérgico sobre ambos.

O teste de reconhecimento de objetos já é bem reconhecido e incentivado na literatura, pois é um teste não-aversivo. Também já se mostrou que não há diferenças nos resultados entre experimentos repetidos neste protocolo, tanto para memória de curto ou longo prazo, sendo, portanto, este paradigma muito útil em estudos longitudinais, particularmente no estudo de memórias em doenças neurodegenerativas ou no declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento (Moore, Deshpande, Stinnett, Seasholtz, & Murphy, 2013).

1.4 PRIVAÇÃO DE SONO

Tanto a privação (evento agudo que pode durar horas ou até dias ininterruptos) quanto à restrição² (evento crônico que dura poucas horas por muitos dias) de sono têm se tornado cada vez mais comuns, gerando grande impacto na sociedade, e não apenas em pacientes com doenças neurodegenerativas. Em um primeiro momento, muitos estudos visando investigar a fisiologia do sono foram conduzidos utilizando-se protocolos de privação total, mas inúmeros experimentos têm sido especificamente delineados para melhor mimetizar a restrição de sono ou de distúrbios de sono como eles ocorrem em humanos, e, em vez de uma privação aguda total, nesses modelos os animais são submetidos a uma restrição crônica (Meerlo et al, 2009). Vários destes estudos mostraram uma diminuição substancial no número das células hipocampais após a restrição crônica de sono por atividade forçada e até mesmo na proliferação destas células, variando de 30 a 80% entre os resultados (Roman et al., 2005; Mirescu et al., 2006; Guzman-Marin et al., 2007). Além deste impacto na proliferação celular, a privação ou perturbação de sono tem impacto na sobrevivência, maturação e diferenciação de novas células que estão nascendo no hipocampo (Guzman-Marin et al., 2005); mas, mais importante, a proliferação de células progenitoras não é afetada pela privação aguda de sono, enquanto a fragmentação do sono

² Na literatura não há uma definição clara dos limites de duração de tempo ou intensidade para diferenciar privação de restrição de sono. Portanto adotamos essa classificação que indica a restrição como uma privação de sono por algumas horas por dia, seguidos de períodos de repouso (sono rebote ou apenas rebote). Esse procedimento deverá ser repetido por dias (em nosso protocolo 21 dias) a fim de mimetizar uma cronicidade.

reduz o número de novas células desenvolvendo-se em neurônios. Essa fragmentação causa uma perda significativa de sono REM, mas a quantidade de sono de ondas lentas não diferencia dos controles (Guzman-Marin et al., 2007).

Em um contexto de doenças neurodegenerativas, o protocolo de restrição crônica de sono por 6h diárias em modelo animal da doença de Alzheimer promoveu prejuízos na memória contextual e acúmulo dos níveis corticais de A β e pTau, correlacionados também com os níveis circulantes destes metabólitos (Rothman et al., 2013). Considerando esses resultados junto à informação de que pacientes com Alzheimer que apresentam sonolência diurna excessiva exibem mais sinais motores parkinsonianos (Park et al., 2006), e os prejuízos de sono já bem conhecido da DP, fica evidente a necessidade de estabelecer os possíveis efeitos correlacionando os efeitos da restrição de sono no âmbito da DP. Nesse âmbito, um protocolo de restrição de sono durante a fase clara em dias intercalados por uma semana demonstrou que os mecanismos de prejuízos de sono têm papel crucial no desenvolvimento da discinesia induzida por levodopa (Galati et al., 2015). Em um modelo de parkinsonismo em drosófilas, um único episódio de restrição, durante 12 horas, foi suficiente para prejudicar a memória de curto prazo dos animais por pelo menos 3 dias (Seugnet, Galvin, Suzuki, Gottschalk, & Shaw, 2009).

1.4.1 Privação de Sono por Gentle Handling

Neste contexto, a necessidade de privar de sono os animais por um curto período de tempo (de no máximo 6 horas diárias) pode ser atingida utilizando-se o protocolo de *gentle handling/stimulation* (Vecsey and Wimmer, 2013), assemelhando essa restrição com a aquela observada em humanos, ou seja, privando tanto o sono de ondas lentas quanto o REM, portanto, não restringindo as alterações a apenas uma fase do sono. A privação pode ser obtida com diferentes abordagens de estimulação, que podem envolver bater ou sacudir gentilmente a caixa, erguer a grade da caixa de contenção e, se não for suficiente para manter os animais acordados, perturbar o ninho de sono. Estudos demonstraram através de eletroencefalografia que este procedimento é efetivo para manter os animais acordados durante diversas horas, sem ser um fator estressante preponderante (Meerlo et al, 2001; Hagewoud et al, 2010a; Hagewoud et al, 2010b). Em um experimento utilizando hamster-

sírio, a restrição de sono por *gentle handling* durante um período de 3 horas foi suficiente para causar uma mudança de fase no ritmo circadiano dos animais, com alteração na expressão de c-Fos em estruturas do Núcleo Supraquiasmático (SCN), enquanto outras intervenções como estresse de confinamento, método da plataforma e injeções de cafeína não surtiram o mesmo efeito (Antle and Mislberger, 2000; Webb et al, 2010). Além disso, a privação de sono total, diferentemente da privação de sono REM, afeta negativamente tanto a consolidação quanto a evocação em testes de memória aversiva, demonstrando que o sono de ondas lentas desempenha um papel crítico no processamento de memórias (Patti et al., 2010); na verdade, cada vez mais se evidencia o papel complementar dos dois estágios do sono na memória (Diekelmann & Born, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Os dados da literatura mostram uma grande correlação entre a regulação de sono e as estruturas afetadas pela DP. Observa-se uma grande carência que evidencie os mecanismos envolvidos e como essas condições se relacionam entre si, principalmente no contexto de que a grande maioria dos pacientes com DP sofrem de distúrbios de sono, que diminuem muito a qualidade de vida, além dos prejuízos cognitivos. Além disso, cada vez mais se evidencia a importância dos aspectos de ritmicidade na doença, e, sendo o sono um marcador proeminente do ritmo circadiano, o protocolo de restrição crônica de sono em um contexto de DP é uma abordagem interessante para estudar esses mecanismos em um contexto de doença neurodegenerativa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações comportamentais causadas pela restrição crônica de sono em modelo animal de Parkinsonismo induzido por rotenona em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da restrição crônica de sono forçada no desenvolvimento de modelo animal de DP e a inter-relação entre as duas condições.
- Analisar os efeitos motores e cognitivos da restrição crônica de sono na DP através de testes do campo aberto, actimetria e de reconhecimento de objetos.
- Investigar as possíveis alterações circadianas nos animais expostos à restrição crônica de sono e seus desdobramentos em modelo de DP durante o sono rebote.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CEUA/BIO da Universidade Federal do Paraná (nº #858), que visam à aplicação de princípios éticos modernos em relação ao uso de animais de experimentação. Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 280-330g, mantidos em grupos de quatro animais em caixas de propileno em uma sala com padrões de umidade e temperatura controlados ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12 h (7:00-19:00h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Figura 2 apresenta a distribuição dos animais nos grupos e a Figura 3 traz o desenho experimental. Os procedimentos estão detalhados nos tópicos subsequentes.

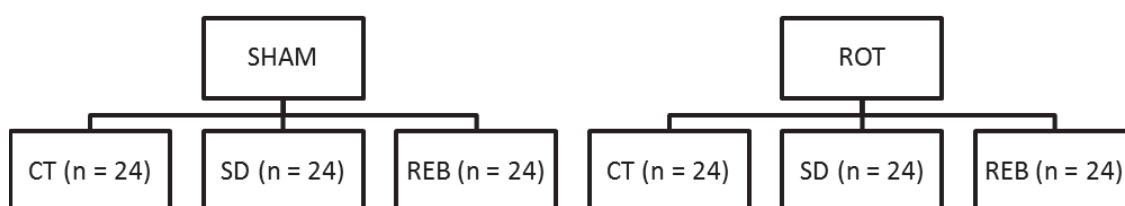


Figura 2. Distribuição dos animais nos grupos. SHAM – veículo; ROT – lesão com rotenona; CT – Controle; SD – Restrição Crônica de Sono; REB – Rebote.

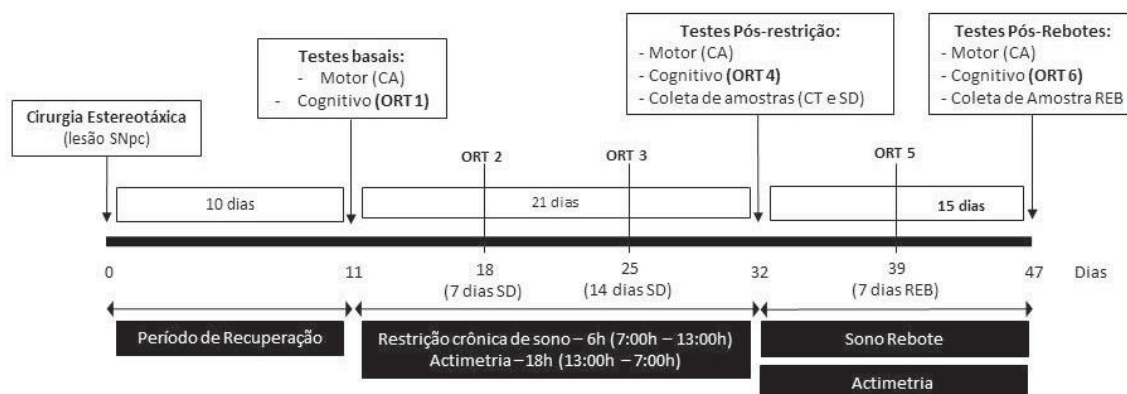


Figura 3. Desenho experimental fora de escala. Os testes comportamentais foram realizados iniciando às 7:00h.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram sedados injetados com xilasina (10 mg/kg) e então anestesiados com quetamina (90 mg/kg). Para a infusão bilateral de rotenona na SNpc as coordenadas, a partir do bregma, serão: (AP) = - 5,0 mm, (ML) = \pm 2,1 mm e (DV) = - 8,0 mm (Paxinos and Watson, 2005). Agulhas foram guiadas até a região de interesse e foi feita a infusão de 1 μ L da neurotoxina (12 μ g/ μ L) utilizando micro seringa de 10 μ L (Hamilton Apparatus) com auxílio de uma bomba de infusão eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil), a uma taxa de 0,33 μ L/min, durante 3 minutos. Os animais do grupo sham foram injetados apenas com veículo (DMSO – dimetilsulfóxido), nas mesmas condições. Após as cirurgias, os animais ficaram acomodados nas caixas de manutenção durante um período de 10 dias para recuperação antes dos testes.

4.4 PRIVAÇÃO CRÔNICA DE SONO

Foi realizada através do método *gentle handling/stimulation*, que consiste em manter os animais acordados através de leve intervenção em suas caixas de contenção (pequenas batidas ou sacudir a caixa gentilmente) e, se não fosse suficiente para manter os animais acordados, as grades da caixa de contenção eram retiradas ou então o ninho de sono era perturbado. Durante 21 dias os animais foram submetidos a 6 horas diárias de restrição, iniciando às 7 horas (início da fase clara) até as 13 horas, sendo esse o período em

que o animal dorme durante mais tempo (van der Borght et al, 2006). Os animais do grupo controle foram mantidos em suas caixas de contenção no mesmo ambiente sem serem perturbados. Após o período de restrição de sono, os animais permaneceram no aparato de actimetria.

4.5 TESTE DO CAMPO ABERTO

O campo aberto consiste em uma arena circular de metal com 1 metro de diâmetro e 50 cm de altura. O teste se inicia quando os animais são colocados sobre o círculo central, para que seus comportamentos motores sejam avaliados por um período pré-determinado de 5 minutos. Todas as análises foram registradas e realizadas por meio de câmera digital acoplada ao sistema Smart Junior (Panlab, - Harvard Apparatus Espanha) (Nosedá et al, 2014).

4.6 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O aparato execução reconhecimento de objetos consiste em um campo aberto retangular (80 x 80 x 50cm), feito de madeira com o fundo coberto com um filme plástico opaco preto e iluminação fraca. Os objetos estímulo utilizados na tarefa são biologicamente neutros e não possuem significância comportamental para os animais experimentais, de maneira que nunca foram associados a um reforço (Ennaceur and Delacour 1988). A cada passagem de animal, a arena, assim como os objetos estímulo, foram desinfetados com uma solução de etanol a 70% para garantir a ausência de pistas olfativas. A exploração foi definida como cheirar ou tocar os objetos com o focinho ou as patas dianteiras; sentar no objeto ou permanecer ao redor dele não foi considerado comportamentos exploratórios.

O teste consiste em 2 fases: uma de aquisição e uma de escolha. Na fase de aquisição (treino), o animal foi exposto 4 vezes durante 3 minutos, com um intervalo de 15 minutos entre cada exposição, a 2 objetos idênticos, posicionados a 10 cm das paredes lateral e de trás da arena. Vinte e quatro horas após o treino, o primeiro teste de escolha foi realizado, onde um dos objetos familiares foi substituído por outro objeto novo para o

animal. O teste se repetiu a cada sete dias durante o período de experimentação, onde o objeto novo foi novamente substituído por outro objeto não-familiar ao animal, totalizando quatro testes para os animais que passaram apenas pela restrição de sono e seis para os animais que permaneceram no rebote após o término do período de restrição. A atividade dos animais na exploração é filmada e posteriormente avaliada por observação manual por um único experimentador que não teve conhecimento do grupo (ROT ou SHAM) e tratamento (CT ou SD) dos animais.

4.7 ACTIMETRIA

A atividade motora dos animais foi mensurada por actimetria em suas caixas de contenção diariamente após a restrição de sono e durante todo o período rebote. O actímetro, manufaturado no próprio laboratório, consiste em um sensor de movimento infravermelho, conectada a um computador que registra as interrupções em seu feixe de luz. O programa registra a quantidade de atividade em segundos a cada 5 minutos (Neto, Carneiro, Valentinuzzi, & Araujo, 2008).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar as hipóteses (H_0 = não há diferença significativa nos resultados obtidos), os dados foram testados quanto à normalidade, homogeneidade entre as variâncias e esfericidade e, a partir do resultado obtido, foram realizados os testes recomendados (Teste t não-pareado; ANOVA de uma via; ANOVA de duas vias para os fatores restrição e lesão; ANOVA mista para os fatores restrição, lesão e tempo; pós-teste de Fisher). Os valores foram expressos como média + E.P.M (erro padrão da média). O nível de significância de $p < 0,05$ foi considerado para que se rejeitasse a hipótese de nulidade.

Para o Teste de Reconhecimento de objetos, além da análise bruta do tempo de exploração de cada objeto, foi realizada uma análise do escore de exploração (tempo no objeto não-familiar – tempo no objeto familiar).

5 RESULTADOS

5.1 CAMPO ABERTO

A análise do padrão motor dos animais revelou não haver diferença significativa na atividade locomotora basal entre os grupos sham e rotenona ($p=0,50$) (Figura 4).

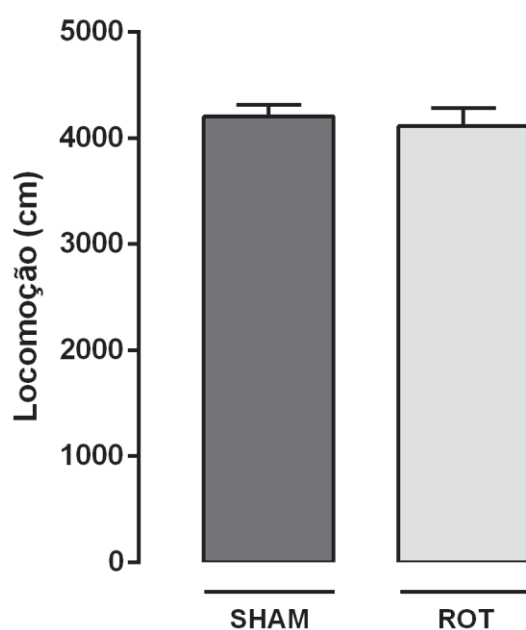


Figura 4. Distância percorrida pelos animais no teste basal do Campo Aberto. As barras representam as médias \pm Erro Padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados através de Teste T não-pareado com correção de Mann-Whitney (sham $n=68$; rotenona $n=61$).

Entretanto, na atividade quantificada após o período de 21 dias de restrição de sono, foi possível observar uma redução significativa na locomoção do grupo Rotenona Controle, tanto em relação aos demais grupos após o período de restrição, com efeito tanto da lesão [$F(1,125) = 4.415$; $P < 0.05$] quanto da privação de sono [$F(1,125) = 3.964$; $P < 0.05$] na atividade locomotora dos animais (Figura 5).

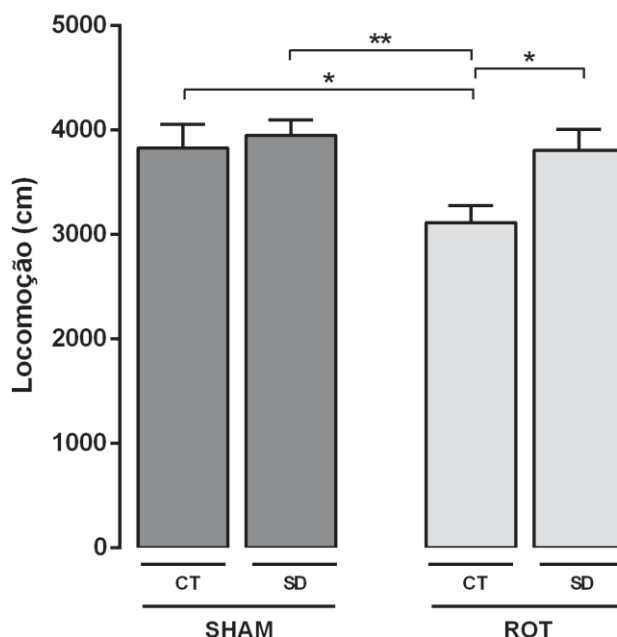


Figura 5. Distância percorrida pelos animais no teste de Campo Aberto após o período de restrição de sono. As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher. $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$ (SHAM BASAL $n = 97$; ROT BASAL $n = 94$; SHAM CT $n = 21$; ROT CT $n = 18$; SHAM SD $n = 46$; ROT SD $n = 41$). CT = Controle; SD = Restrição de Sono.

A redução significativa da locomoção no grupo ROT-CT mostra que a lesão com rotenona gerou um prejuízo motor típico da DP e, ainda, a redução em relação ao grupo ROT-SD revela que a restrição de sono reverteu ou preveniu esse efeito, possivelmente através de uma supersensibilidade dopaminérgica.

Comparando-se os resultados de locomoção obtidos imediatamente após o término do período de rebote, não foi observada diferença significativa da lesão [$F(1,41) = 0,20$; $P = 0,65$], mas verificou-se um efeito significativo relacionado ao fator tempo [$F(2,82) = 19,45$; $P < 0,0001$] (Interação [$F(2,82) = 0,49$; $P = 0,61$]) (Figura 6). No grupo sham, foi observada uma diminuição da atividade locomotora após o rebote em relação aos resultados obtidos no teste basal ($p < 0,0003$) e se comparado ao desempenho após a restrição ($p < 0,001$); o mesmo foi observado no grupo rotenona (ROT REB x ROT BASAL $p < 0,0001$; ROT REB x ROT SD $p < 0,004$).

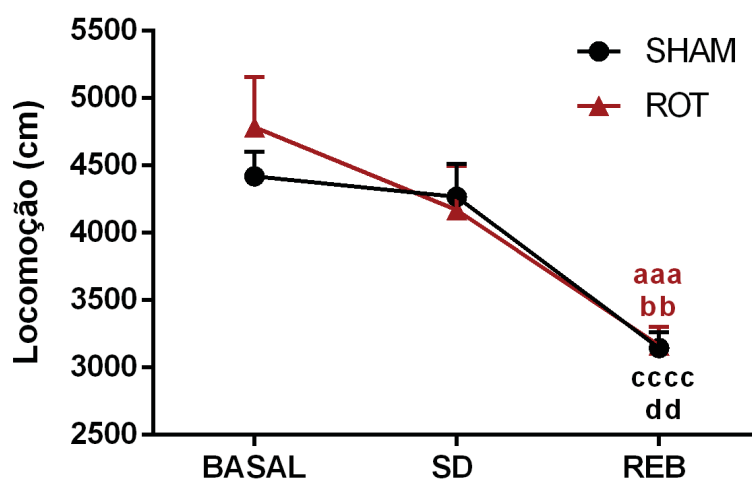


Figura 6. Evolução da distância percorrida pelos animais no teste de Campo Aberto. Os símbolos representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de pós-teste de Fisher. ROT REB x ROT BASAL aaa $p \leq 0,001$; ROT REB x ROT SD; bb $p \leq 0,004$; SHAM REB x SHAM BASAL cccc $p \leq 0,0001$; SHAM REB x SHAM SD dd $p \leq 0,01$ (SHAM n= 22; ROT n= 21).

5.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Nos resultados relativos ao Teste de Reconhecimento de Objetos (ORT) pôde-se observar uma diferença significativa entre o tempo de exploração dos objetos no grupo sham já no primeiro teste (ORT 1), realizado antes do início da privação, com efeito do objeto [$F(1,2) = 12,23$; $P < 0,001$] e do grupo [$F(3,2) = 7,6$; $P < 0,0001$] (Interação: [$F(3,2) = 0,36$; $P = 0,78$] (Figura 7 - ORT1). No grupo rotenona, além de não haver diferença no tempo de exploração entre os objetos, foi possível perceber uma diminuição no tempo geral de exploração quando comparado ao sham (ROT-SD vs SHAM-CT, $P < 0,05$; ROT-SD vs SHAM-SR, $P < 0,001$; ROT-CT vs SHAM-SR, $P < 0,05$) (as entre os grupos diferenças não são apontadas nos gráficos para fins de clareza).

No segundo teste (ORT 2 – 7 dias após o início da restrição de sono), observou-se apenas efeito do grupo [$F(3,188) = 13,85$; $P < 0,0001$] (Objeto: $F(1,188) = 0,93$; $P < 0,33$; Interação: $F(3,188) = 0,13$; $P = 0,93$] sem diferença significativa no tempo de exploração entre o objeto não-familiar e o objeto familiar entre os grupos testados (Figura 7 - ORT2). Observou-se que o grupo rotenona restrição de sono explorou menos tanto o objeto não-familiar em comparação a todos os outros grupos (ROT-SD vs SHAM-CT, $p < 0,0001$; ROT-SD vs

SHAM-SD, $p < 0,0001$; ROT-SD vs ROT-CT, $p < 0,05$) quanto o familiar, em relação aos grupos sham (ROT-SD vs SHAM-CT, $p < 0,001$; ROT-SD vs SHAM-SD, $p < 0,0001$).

No teste realizado 14 dias após o início da restrição (ORT 3), observou-se efeito do grupo [$F(3,2) = 8,1$; $P < 0,0001$] e do objeto [$F(1,2) = 6,95$; $P < 0,01$] (Interação $F(3,2) = 0,44$; $P = 0,72$), sendo que apenas grupo SHAM-CT apresentou diferença estatisticamente significativa no tempo de exploração do objeto não-familiar em relação ao familiar ($P < 0,05$) (Figura 7 - ORT3). Houve um menor tempo de exploração do objeto não-familiar do grupo ROT-CT em relação aos grupos SHAM-CT ($p < 0,05$) e do grupo ROT-SD, quando comparado aos dois grupos sham (vs SHAM-CT, $p < 0,01$; vs SHAM-SD, $p < 0,001$), e, para o objeto familiar, percebeu-se que o grupo ROT-SD explorou menos que o grupo SHAM-SD ($p < 0,01$).

No último teste após o período de restrição de sono (ORT 4), observou-se efeito de grupo [$F(3,20) = 9,98$; $P < 0,0001$] e do objeto [$F(1,2) = 10,01$; $P < 0,01$], sem interação entre ambos [$F(3,2) = 1,02$; $P = 0,38$]. Neste teste foi possível observar que apenas o grupo SHAM-CT explorou mais o objeto não-familiar ($p < 0,01$). Houve diferença nos tempos de exploração tanto do objeto familiar, sendo que o grupo SHAM-SD explorou mais o objeto em relação aos dois grupos ROT (ROT-CT vs. SHAM-SD, $p < 0,01$; ROT-SD vs. SHAM-SD, $p = 0,01$), quanto do não-familiar (ROT-CT vs. SHAM-CT, $p < 0,05$; ROT-SD vs. SHAM-CT, $p < 0,01$; ROT-CT vs. SHAM-SD, $p = 0,05$; ROT-SD vs. SHAM-SD, $p < 0,001$) entre os grupos (Figura 7 - ORT 4).

No primeiro teste após o rebote (ORT 5), realizado 7 dias após o fim da restrição, foi observado efeito do grupo [$F(1,62) = 5,62$; $P < 0,05$] e do objeto [$F(1,62) = 8,26$; $P < 0,01$], sem interação entre os fatores [$F(1,62) = 2,62$; $P = 0,11$], onde o grupo sham explorou mais o objeto não-familiar ($p < 0,01$). Verificou-se ainda que o grupo rotenona explorou por um tempo menor o objeto não-familiar em relação ao grupo sham ($p < 0,01$) (Figura 7 – ORT 5). No último teste (ORT 6), procedido ao fim do período rebote (15 dias após o fim da restrição), o efeito observado foi dado pelo objeto [$F(1,62) = 6,83$; $P < 0,05$] (Grupo: [$F(1,62) = 3,4$; $P = 0,07$; Interação: [$F(1,62) = 0,64$; $P = 0,42$], pois o grupo sham explorou mais o objeto não-familiar ($p < 0,05$) sem diferença no tempo de exploração dos objetos entre os grupos (Figura 7 - ORT6).

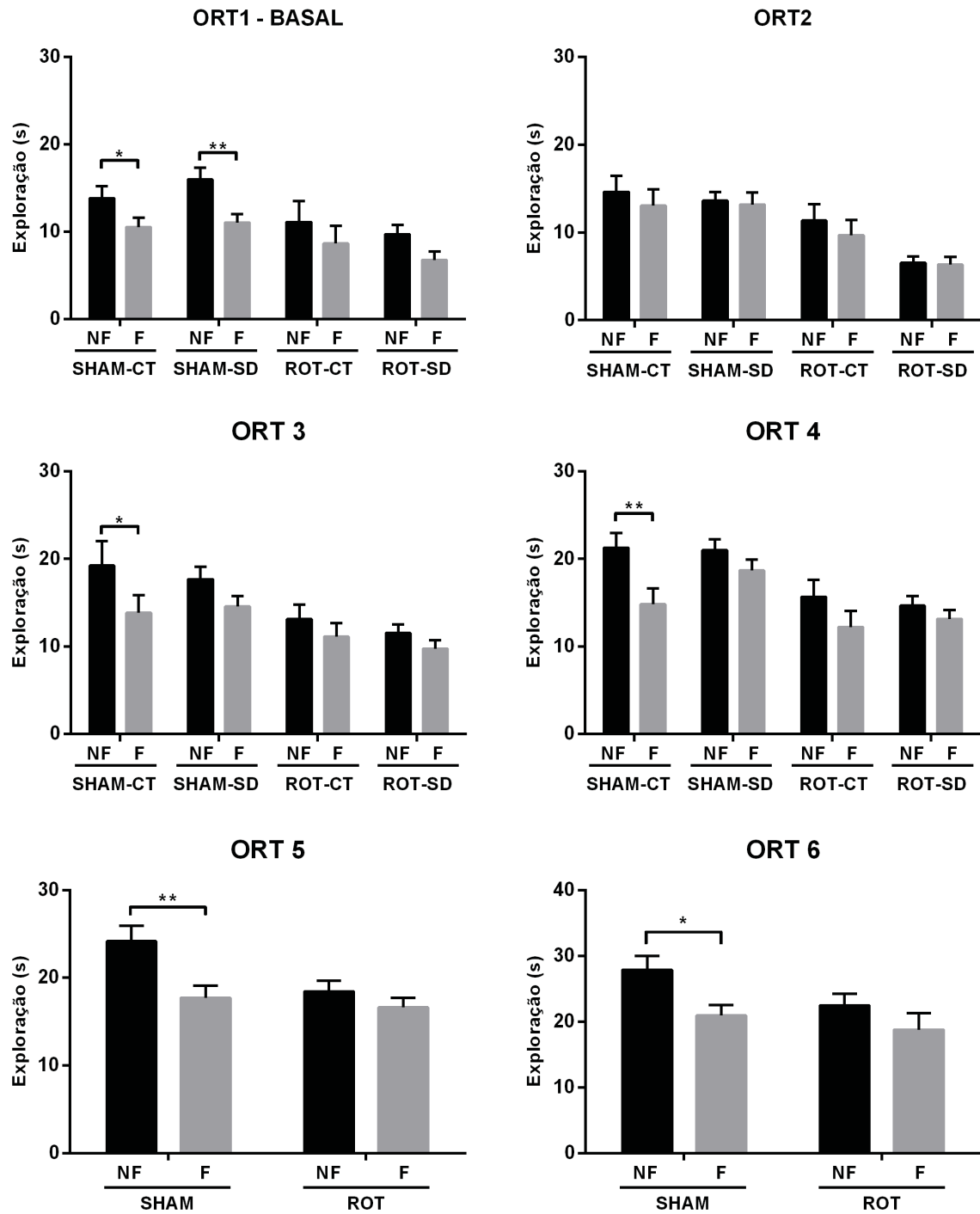


Figura 7. Tempo de exploração do objeto familiar e do objeto não-familiar no teste Reconhecimento de objetos ao longo do experimento. As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher para as diferenças intra-grupo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). As diferenças inter-grupos estão descritas no texto. ORT 1 (basal): SHAM $n = 69$; ROT $n = 60$; ORT 2 (7 dias de SD), 3 (14 dias de SD) e 4 (21 dias de SD): SHAM CT $n = 21$; ROT CT $n = 18$; SHAM SD $n = 46$; ROT SD $n = 41$; ORT 5 (7 dias de REB) e 6 (15 dias de REB): SHAM $n = 22$; ROT $n = 21$. CT = Controle; SD = Restrição de Sono. Barras cinzas representam o tempo de exploração do objeto familiar (F) e as barras pretas o tempo de exploração do objeto não-familiar (NF).

Ao realizar o cálculo do escore de exploração obtido com os resultados dos testes de reconhecimento realizados ao longo do experimento, foi possível observar que o maior impacto na cognição foi decorrente da SD, pois ao longo dos testes o escore do grupo SHAM-CT aumenta, culminando em uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos SD no último teste ($p < 0,05$). Após o término da privação, é possível observar que o grupo ROT-REB apresenta um atraso na recuperação cognitiva, pois na primeira semana há uma diferença estatisticamente significativa no escore de exploração entre o SHAM-REB e ROT-REB, que se perde após os 15 dias de recuperação, em consequência do aumento do escore do grupo (Figura 8).

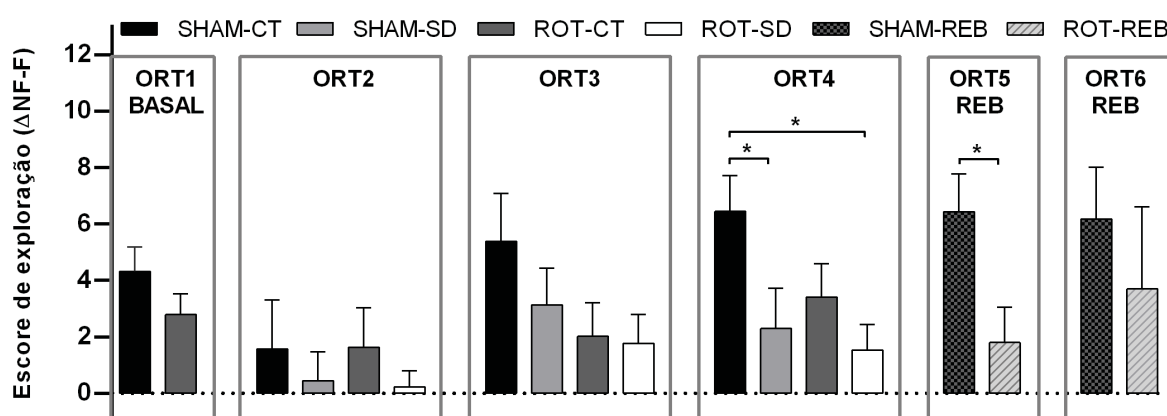


Figura 8. Índice de exploração no teste de reconhecimento de objetos. As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher $*p \leq 0,05$. CT = Controle; SD = Restrição de Sono.

A curva de aprendizado do grupo SHAM-CT ao longo do período de privação fica evidente se comparado ao grupo SHAM-SD. No gráfico 9 é possível observar o aumento no escore de exploração deste grupo no último teste em relação ao ORT 1 e 2 ($P < 0,05$), diferença que não é observada nos demais grupos (efeito do teste/tempo: $[F(3,39) = 3,03; P < 0,05]$; grupo: $[F(3,39) = 2,54; P < 0,05]$; Interação: $[F(9,39) = 0,84; P = 0,58]$).

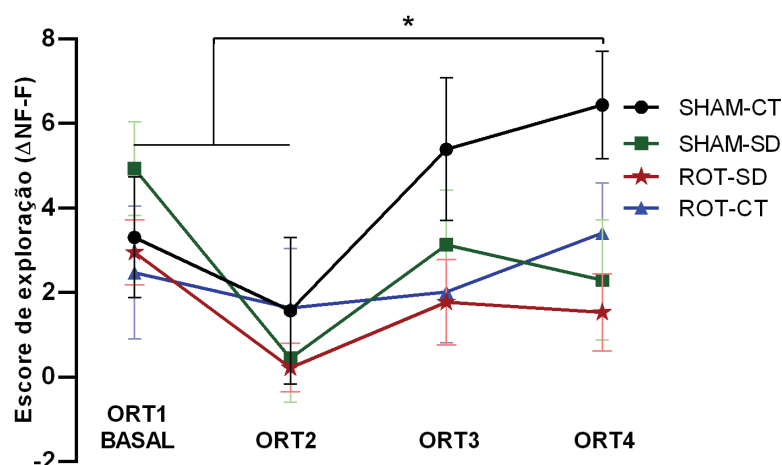


Figura 9. Curva de aprendizado. Os símbolos representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de pós-teste de Fisher; * $p \leq 0,05$.

5.3 ACTIMETRIA

A partir dos actogramas obtidos (ANEXO 1), foi possível estabelecer um perfil de atividade durante 24 horas para cada grupo de animais (ANEXO 2) e, a partir destes, foi analisado o padrão de atividade na primeira hora após o término da restrição crônica de sono (13h-14h) (FIGURA 10) e das duas primeiras horas ao início da fase escura (19h-21h) (FIGURA 11). Na primeira hora após o término da restrição crônica de sono não foi encontrada interação significativa entre os grupos ao longo do tempo, de forma que a variabilidade encontrada foi apenas em decorrência do tempo [$F(12,34) = 29,18$; $P < 0,0001$] ou lesão/restrrição [$F(3,34) = 3,96$; $P < 0,01$], pela própria diminuição da atividade dos animais na fase clara após o término da manipulação. Não houve interação entre os fatores [$F(36,34) = 0,43$; $P > 0,99$] (Figura 10).

Considerando o início do período de atividade dos animais (início da fase escura), observou-se que o grupo rotenona restrição de sono apresentou um atraso no início da sua atividade ao longo do experimento, atingindo o mesmo nível dos demais grupos 90 minutos após o início da fase escura [Fator tempo - $F(24,65) = 3,18$; $P < 0,0001$ / Tratamento - $F(3,65) = 76,69$; $P < 0,0001$ / Interação: $F(72,65) = 0,66$; $P = 0,99$] (Figura 12).

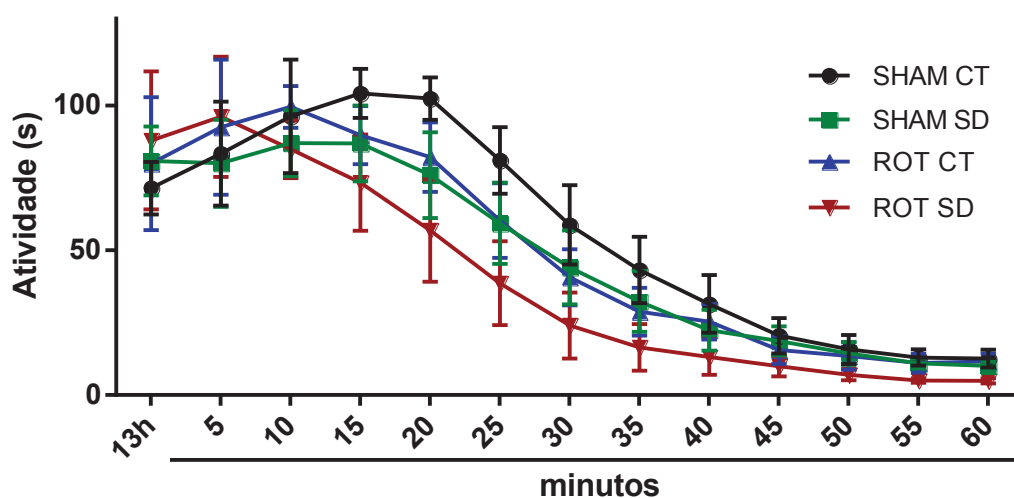


Figura 10. Curva do padrão de atividade na primeira hora após o término da restrição crônica de sono. Os símbolos representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. $n=24$ (6 x 4)/grupo.

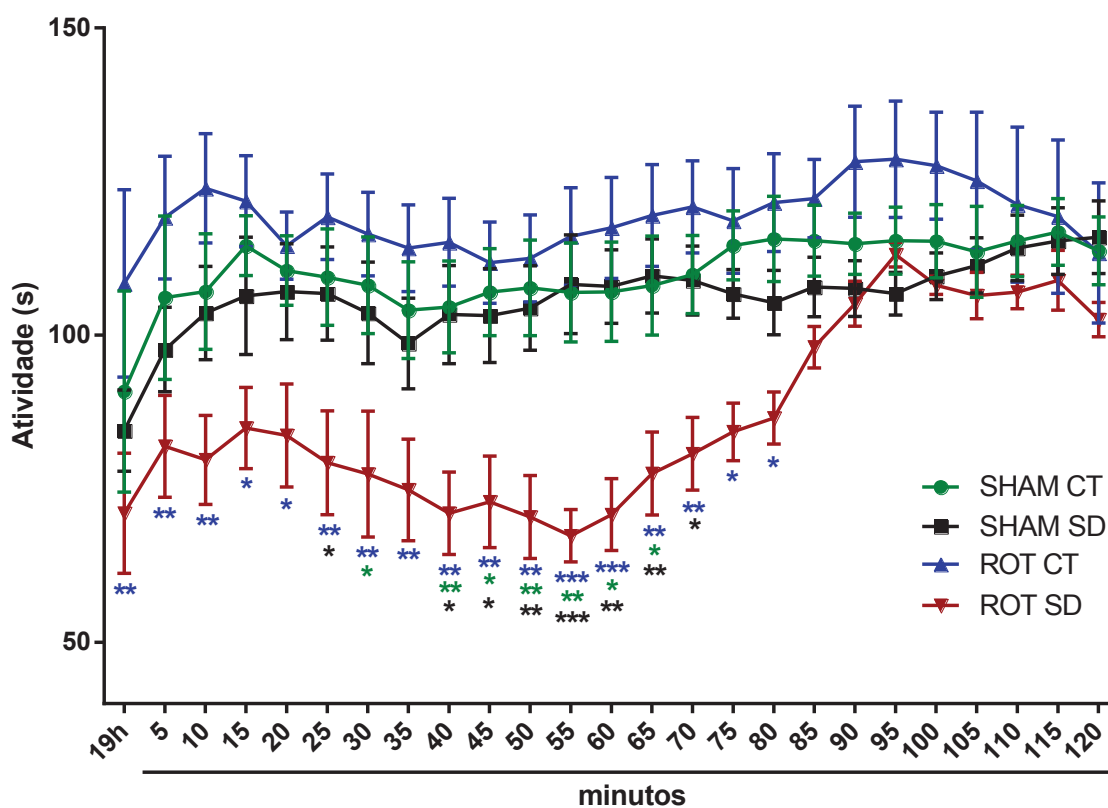


Figura 11. Curva do padrão de atividade nas duas primeiras horas após o início da fase escura. Os símbolos representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$ / Cada cor representa as diferenças do grupo ROT SD em relação ao grupo correspondente (Azul: ROT SD x ROT CT; Verde: ROT SD x SHAM CT; Preto: ROT SD x SHAM SD). $n=24$ (6 x 4)/grupo.

Após o término do período de restrição de sono, durante o rebote, foi possível observar uma diferença significativa no padrão de atividade entre os grupos rotenona e sham ao longo de 24 horas (Interação: $F(287, 29) = 11,02$; $P < 0,0001$ / Atividade: $F(287, 29) = 65,33$; $P < 0,0001$ / Lesão $F(1, 29) = 4,562$; $P = 0,0328$), representada na Figura 12. No ANEXO 3 é possível verificar a diferença estatística entre os dois grupos nos períodos (blocos de 5 minutos) em que essa diferença foi identificada.

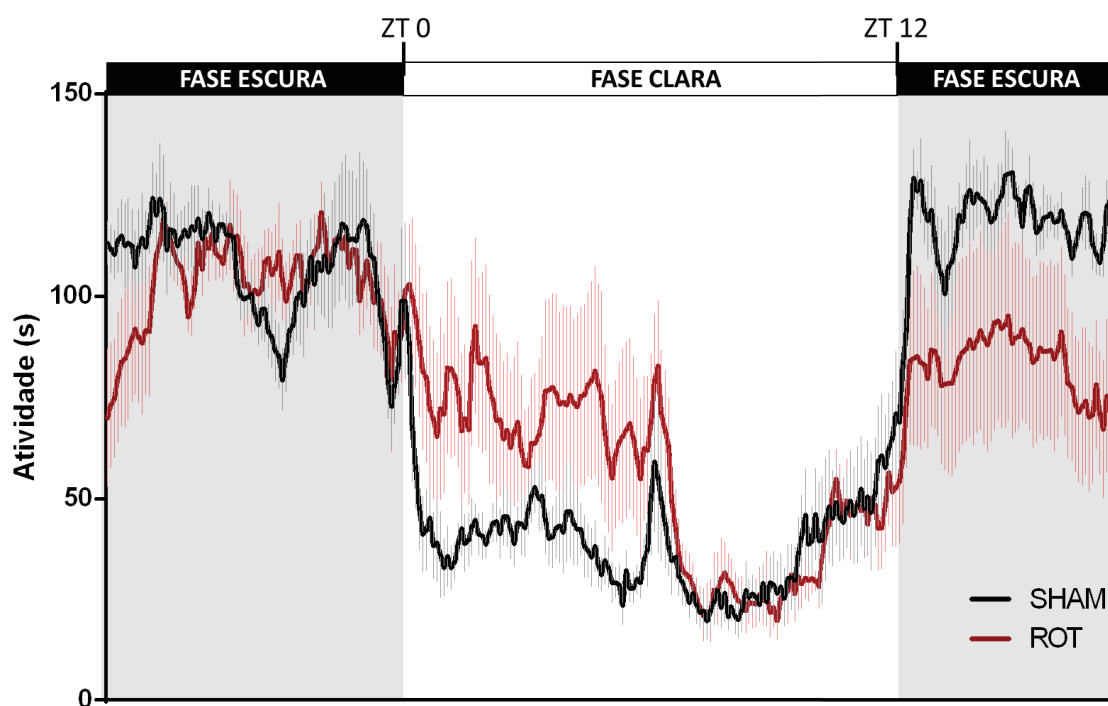


Figura 12. Perfil de atividade diária durante o rebote, após o término do período de restrição crônica de sono. Os símbolos representam as médias de atividade a cada 5 minutos + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey $n=24$ (6 x 4)/grupo.

6 DISCUSSÃO

Geralmente se assume que os efeitos da DA na circuitaria dos núcleos da base é mediada por sua atividade estriatal e que as alterações nos padrões e nas taxas de disparo dos núcleos da base em resposta a lesões nos neurônios dopaminérgicos da SNpc são resultado de anormalidades nas sinapses estriatais (Albin, Young, & Penney, 1989). Diversos estudos têm demonstrado alterações neuroquímicas e neuropatológicas (como morte de neurônios dopaminérgicos, depleção de DA e seus metabólitos e inclusões semelhantes aos corpos de Lewy) na via nigroestriatal após a administração de rotenona, além de alterações motoras no teste do campo aberto, como redução na frequência de locomoção e de levantar, e aumento no tempo de imobilidade (Lin, Huang, Ching, & Chuang, 2008; Moreira et al., 2012). Essa lesão seletiva com rotenona na SNpc gera redução nos níveis de DA, 5-HT e da imunoreatividade para a tiroxina hidroxilase nigral (Caboni et al., 2004; Lin et al., 2008; Moreira et al., 2012; Santiago et al., 2010), efeitos majoritariamente associados a uma maior degradação e turnover de DA na SNpc. Os resultados obtidos no teste do Campo Aberto, que mensuraram a atividade locomotora, corroboram o prejuízo motor causado pela administração de rotenona, provavelmente decorrente da redução de DA.

Entretanto, a privação crônica foi capaz de reverter o déficit locomotor. Esse efeito pode ser explicado por uma possível diminuição de sono REM em decorrência da privação. A privação de sono REM causa um impacto significativo na neurotransmissão dopaminérgica, similar à lesão com rotenona (Dos Santos et al., 2013). Entretanto, animais privados de sono REM podem apresentar hiperatividade atribuída à ocorrência de uma supersensibilidade dos receptores de DA (Tufik, Lindsey, & Carlini, 1978; Tufik, Troncone, Braz, Silva-Filho, & Neumann, 1987). Desta maneira, poderia se inferir-se que o protocolo de restrição também resulte em uma diminuição substancial de sono REM, suficiente para causar supersensibilidade nos receptores dopaminérgicos. Portanto, a restrição de sono parece compensar o prejuízo motor advindo da rotenona. Contudo, o desempenho motor do grupo SHAM-SD não revelou um aumento na atividade locomotora causado pela restrição, como ocorre em modelos de privação aguda de sono REM (Dos Santos et al., 2013), sugerindo que esse efeito seja perceptível apenas em um contexto onde já há o comprometimento das áreas envolvidas.

Os resultados obtidos após o período rebote mostraram uma reversão da supressão de prejuízo motor, sugerindo que os efeitos advindos da supersensibilidade destes receptores sejam transitórios. Estudos mostram que a dopamina contribui com a plasticidade corticoestriatal e o aprendizado motor; assim, perda da inervação dopaminérgica altera o desempenho motor, como é o caso da DP. O bloqueio de receptores D2 induz um aprendizado anômalo que impede o desempenho futuro mesmo quando a sinalização dopaminérgica é restaurada. Esse aprendizado anormal poderia se dar pela potenciação corticoestriatal inapropriada nas células estriado-palidais da via indireta (Beeler, Petzinger, & Jakowec, 2013)

Muitos trabalhos apontam a influência do sono na consolidação de memórias (Graves, Pack, & Abel, 2001; Tononi & Cirelli, 2013). Da mesma maneira, prejuízos cognitivos também foram relatados após a administração intranigral da rotenona (Dos Santos et al., 2013). Entretanto, outros estudos indicam um papel reduzido do sistema dopaminérgico em relação ao reconhecimento de objetos (Steckler, Sahgal, Aggleton, & Drinkenburg, 1998).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que tanto a restrição de sono quanto a lesão surtiram resultaram em prejuízo cognitivo, uma vez que apenas o grupo sham controle explorou significativamente mais o objeto não-familiar, que se refletiu na melhora no escore de exploração ao longo do experimento. De maneira geral, os grupos rotenona apresentaram um menor de tempo de exploração dos objetos, o que poderia revelar um possível desinteresse destes animais, que poderia ser consequência da anedonia e comportamento tipo-depressivo, já demonstrada nesse modelo (Noseda et al., 2014).

É possível encontrar na literatura evidências mostrando que tanto a rotenona, através da lesão dos núcleos da base, quanto a privação de sono prejudicam a memória (Alzoubi, Khabour, Tashtoush, Al-Azzam, & Mhaidat, 2013; Diekelmann & Born, 2010; Estrada et al., 2015; Graves et al., 2001; Moreira et al., 2012; Postle, Locascio, Corkin, & Growdon, 1997; Souchay, Isingrini, & Gil, 2006; Tononi & Cirelli, 2014). Sabe-se que as áreas significativas para o reconhecimento de objetos em ratos são o córtex entorrinal e o córtex perirrinal (Ruby et al., 2013; Steckler, Drinkenburg, Sahgal, & Aggleton, 1998). Como o córtex possui uma aferência primária para o estriado, alterações na plasticidade sináptica que ocorrem no córtex alteram os inputs que chegam aos núcleos da base, afetando tanto o fluxo de informações ao longo dessas estruturas quanto a plasticidade corticoestriatal dependentes de atividade sináptica. Embora a atividade cortical e o aprendizado modelem a

atividade no estriado, evidências sugerem que o estriado aprenda antes e mais rápido e poderia modelar o aprendizado cortical, consistente com a ideia de que os núcleos da base proveriam um filtro para essa atividade cortical (Pasupathy & Miller, 2005). Ao alterar seletivamente o fluxo de informações córtico-basal de aferências corticais específicas, a plasticidade corticoestriatal modela a atividade cortical; modelando a atividade cortical, os núcleos da base influenciam o aprendizado cortical dependente de atividade sináptica (Beeler et al., 2013).

O escore de exploração revelou que o efeito cognitivo mais conspícuo foi da privação, quando comparado ao grupo SHAM-CT. Esse resultado vem de encontro à grande parte da literatura classicamente atribui efeitos prejudiciais na memória associados à privação de sono dentro de diferentes paradigmas (Hagewoud et al., 2010; Kincheski et al., 2017; Palchykova, Winsky-Sommerer, Meerlo, Durr, & Tobler, 2006; Patti et al., 2010). Todavia, em um contexto de lesão, o prejuízo cognitivo parece ser mais pungente, evidenciado pelo fato de que o grupo sham, após 7 dias de rebote, explorou mais o objeto não-familiar, o que não ocorreu no grupo rotenona.

Vale salientar que nossas análises foram baseadas no tempo de exploração, o que poderia proporcionar resultados divergentes em relação àqueles que utilizam a frequência de exploração (Ennaceur *et al.*, 2005). Não menos importante, o protocolo de reconhecimento de objetos utilizado neste experimento poderia ser dependente do hipocampo, pois não foram alteradas as localizações ou a relação objeto-contexto, paradigmas que mostraram envolver o hipocampo durante o teste (Broadbent, Squire, & Clark, 2004).

Em relação aos dados da actimetria, observamos uma evidente alteração nos padrões de atividade do grupo ROT-SD e que não é revertida no período rebote. Diversas alterações de ritmos fisiológicos já foram evidenciadas na literatura em modelos animais de parkinsonismo, como prejuízos no ritmo de vigília-sono, batimentos cardíacos, temperatura e atividade locomotora (Videnovic, Lazar, et al., 2014). Dentre os diversos sinais não-motores sob influência dos ritmos circadianos, os mais contundentes são os distúrbios de sono, que poderiam refletir alterações no padrão temporal de sono resultante de uma disfunção circadiana. Os prejuízos circadianos na DP implicam não apenas na desregulação do ciclo vigília-sono, mas também em manifestações autonômicas, cognitivas, psiquiátricas e motoras da doença (Videnovic & Golombek, 2013).

Um modelo animal transgênico de PD revelou que a atividade neuronal no SCN já se encontra alterada quando se percebe os primeiros sinais motores da doença (Willison et al., 2013). Animais nocaute para o transportador vesicular de monoaminas, além de apresentarem níveis severamente diminuídos das principais monoaminas, também exibiram muitos dos principais sinais não-motores da DP, incluindo latência para dormir e redução da amplitude de seus ritmos diurnos (Taylor et al., 2011).

Com efeito, os distúrbios de sono observados em pacientes com DP também revelam alterações nos ritmos circadianos (Bruguerolle & Simon, 2002). As evidências que sugerem alterações no sistema circadiano na DP têm crescido nos últimos anos, endossadas principalmente pelo papel da DA na regulação de diversos ritmos biológicos e pela influência circadiana em seu metabolismo e sinalização (Videnovic & Golombek, 2013).

Assim, a ligação entre a DP e os ritmos circadianos logicamente se inicia com a investigação do papel da DA. Em ratos, a atividade neuronal dopaminérgica das vias mesolímbicas e nigroestriatal, apresenta maior atividade durante a fase escura enquanto (Bruguerolle & Simon, 2002). Além disso, receptores D1 são expressos no SCN, o marcapasso biológico de mamíferos que regula os ritmos circadianos (Rivkees & Lachowicz, 1997). Evidências adicionais do papel da DA na temporização do sistema circadiano foi observada em um modelo de lesão com 6-hidroxidopamina, onde a lesão dopaminérgica globalizada da via nigroestriatal alterou os ritmos circadianos, os padrões de vigília e sono e a expressão de genes-relógio no estriado (Gravotta et al., 2011); essas alterações que foram parcialmente revertidas com a administração de L-DOPA (Boulamery, Simon, Vidal, & Bruguerolle, 2010). Entretanto, apesar da frequente ocorrência de perturbações nos padrões de sono e vigília na população com DP, os ritmos circadianos ainda não foram sistematicamente estudados da doença (Breen et al., 2014).

Os resultados obtidos na actimetria durante o período de restrição de sono mostram que há uma perturbação no ritmo dos animais rotenona, percebido pelo padrão de atraso no início da atividade no começo da fase escura. Mais importante, esse efeito não foi observado nos grupos SHAM-SD nem mesmo no ROT-CT, indicando que esse efeito é decorrente da lesão associada à restrição de sono. Assim, revela-se um possível sinergismo entre os distúrbios de sono e alterações circadianas. Esse resultado vem de encontro ao observado na literatura, que, até onde se teve conhecimento, procura estabelecer uma ordem de causa-efeito, onde as alterações circadianas afetariam os distúrbios de sono ou

vice-versa. Nossos resultados evidenciam a possibilidade de que os mecanismos que afetam um sistema igualmente afetam o outro, e que a ocorrência de um contribui com a progressão do outro, potencialmente apresentando um mecanismo de retroalimentação.

Sobremaneira, uma alteração circadiana também foi evidenciada no período rebote, sugerindo que esses prejuízos são duradouros. Durante este período, o perfil de atividade durante 24 horas revelou que os animais ROT-SD apresentaram um nível de atividade maior logo após o início da fase clara (das 7h às 13h) e, de maneira contrária, menor atividade no início da fase escura (19h-0h). Essas alterações podem ser correlacionadas com os distúrbios comumente encontrados em pacientes com DP, onde 30 a 75% dos portadores apresentam sonolência diurna excessiva e 74–98% revelam distúrbios de sono (Wegelin, McNamara, Durso, Brown, & McLaren, 2005). Mais ainda, os dados contribuem com visão de que a sonolência diurna excessiva não apenas um efeito dos distúrbios de sono, mas um fator independente ligado ao processo patológico (Arnulf et al., 2002). Esse efeito possivelmente está correlacionado com alterações nos ritmos circadianos, pois pacientes com DP que apresentam sonolência diurna excessiva também apresentam uma diminuição da amplitude de secreção de melatonina (Videnovic, Noble, et al., 2014).

Esses aspectos contribuem com a visão de que os distúrbios de sono e as alterações circadianas observadas em pacientes com DP não sejam meramente efeitos subsidiários da deterioração motora, mas uma parte integral da doença. Com efeito, os prejuízos de sono, perturbação do ritmo circadiano e desordens motoras apresentam-se diretamente relacionados com a depleção dopaminérgica da via nigroestriatal, com desdobramentos interdependentes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A restrição crônica de sono no modelo animal de parkinsonismo induzido por rotenona mostrou ser um modelo interessante para se investigar as interações entre os distúrbios de sono, as alterações circadianas, a deterioração motora e os prejuízos cognitivos em um contexto de DP;
- A restrição crônica de sono *per se* não apresentou prejuízos comportamentais significativos, evidenciando ainda mais a importância de esclarecer os mecanismos que determinam seus efeitos sinérgicos com a DP;
- A inter-relação entre os sinais motores e não-motores da DP, baseando-se na literatura, possivelmente apresenta a depleção dopaminérgica da via estriatal como o mecanismo subjacente de sua progressão. Futuramente, ensaios imunohistoquímicos deverão ser realizados para confirmação;
- As alterações circadianas acarretadas pela DP, associada à restrição crônica de sono, se mostraram perduráveis, refletindo em padrões diferentes do ciclo sono-vigília dos animais lesionados, observados mesmo durante o período de sono rebote.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos evidenciam a necessidade de entender e perscrutar a DP como um processo neurodegenerativo globalizado, com inúmeros desdobramentos. Além do mais, salienta-se a importância dos distúrbios de sono e alterações circadianas serem considerados como elementos ativos na progressão da doença, paralelamente aos já conhecidos prejuízos motores, revelando a necessidade de se investir esforços em incluir esses aspectos no prognóstico e tratamento da DP.

REFERÊNCIAS

- Alam, M., & Schmidt, W. J. (2002). Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res*, 136(1), 317-324.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12(10), 366-375.
- Alzoubi, K. H., Khabour, O. F., Tashtoush, N. H., Al-Azzam, S. I., & Mhaidat, N. M. (2013). Evaluation of the effect of pentoxifylline on sleep-deprivation induced memory impairment. *Hippocampus*, 23(9), 812-819. doi: 10.1002/hipo.22135
- Antle, M. C., & Mistlberger, R. E. (2000). Circadian Clock Resetting by Sleep Deprivation without Exercise in the Syrian Hamster. *The Journal of Neuroscience*, 20(24), 9326-9332.
- Antonelli, F., and A. P. Strafella (2014). Behavioral disorders in Parkinson's disease: The role of dopamine. *Parkinsonism & Related Disorders*, Volume 20 , S10 - S12.
- Arnulf, I., Konofal, E., Merino-Andreu, M., Houeto, J. L., Mesnage, V., Welter, M. L., . . . Agid, Y. (2002). Parkinson's disease and sleepiness: an integral part of PD. *Neurology*, 58(7), 1019-1024.
- Beeler, J. A.; Petzinger, G.; Jakowec, M. W. The Enemy within: Propagation of Aberrant Corticostriatal Learning to Cortical Function in Parkinson's Disease. *Front Neurol*, v. 4, p. 134, 2013. ISSN 1664-2295
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3(12), 1301-1306. doi: 10.1038/81834
- Bonuccelli, U., Del Dotto, P., Lucetti, C., Petrozzi, L., Bernardini, S., Gambaccini, G., . . . Piccini, P. (2000). Diurnal motor variations to repeated doses of levodopa in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*, 23(1), 28-33.
- Bordet, R., Devos, D., Brique, S., Touitou, Y., Guieu, J. D., Libersa, C., & Destee, A. (2003). Study of circadian melatonin secretion pattern at different stages of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*, 26(2), 65-72.
- Boulamery, A., Simon, N., Vidal, J., & Bruguierolle, B. (2010). Effects of L-Dopa on circadian rhythms of 6-OHDA striatal lesioned rats: a radiotelemetric study. *Chronobiol Int*, 27(2), 251-264. doi: 10.3109/07420521003664213
- Bove, J., Prou, D., Perier, C., & Przedborski, S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, 2(3), 484-494. doi: 10.1602/neurorx.2.3.484
- Breen, D. P., Vuono, R., Nawarathna, U., Fisher, K., Shneerson, J. M., Reddy, A. B., & Barker, R. A. (2014). Sleep and circadian rhythm regulation in early Parkinson disease. *JAMA Neurol*, 71(5), 589-595. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.65
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(40), 14515-14520. doi: 10.1073/pnas.0406344101

- Bruguerolle, B., & Simon, N. (2002). Biologic rhythms and Parkinson's disease: a chronopharmacologic approach to considering fluctuations in function. *Clin Neuropharmacol*, 25(4), 194-201.
- Caboni, P., Sherer, T. B., Zhang, N., Taylor, G., Na, H. M., Greenamyre, J. T., & Casida, J. E. (2004). Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol*, 17(11), 1540-1548. doi: 10.1021/tx049867r
- Castaneda, T. R., de Prado, B. M., Prieto, D., & Mora, F. (2004). Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J Pineal Res*, 36(3), 177-185.
- Chahine, L., Stern, M., & Chen-Plotkin, A. (2014). Blood-Based Biomarkers for Parkinson's Disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20(0 1), S99-103.
- Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*, 8(5), 464-474. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70068-7
- Chesselet, M. F., & Richter, F. (2011). Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol*, 10(12), 1108-1118. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70227-7
- De Cock, V. C., M. Vidailhet, I. Arnulf (2008). Sleep disturbances in patients with parkinsonism. *Nature Clinical Practice Neurology* 4 (5), 254-266.
- Del Tredici, K., & Braak, H. (2012). Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27(5), 597-607. doi: 10.1002/mds.24921
- Del Tredici, K., & Braak, H. (2015). Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of alpha-synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*. doi: 10.1111/nan.12298
- Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci*, 11(2), 114-126. doi: 10.1038/nrn2762
- Dos Santos, A. C., Castro, M. A., Jose, E. A., Delattre, A. M., Dombrowski, P. A., Da Cunha, C., . Lima, M. M. (2013). REM sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, 91(11), 1508-1516. doi: 10.1002/jnr.23258
- Easton, A., P. Meerlo, B. M. Bergmann, F. W. Turek (2004). The suprachiasmatic nucleus regulates sleep timing and amount in mice. *Sleep* (27):1307-18.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, et al. (2003). α -Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17: 1945-1947
- Elbaz, A., & Tranchant, C. (2007). Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 262(1-2), 37-44. doi: 10.1016/j.jns.2007.06.024
- Erro, R., G. Santangelo, M. Picillo, C. Vitale, M. Amboni, K. Longo, A, Costagliola, M. T. Pellecchia, R. Allocca, A. Rosa, G. Michele, L. Santoro, P. Barone (2012). Link between non-motor symptoms and cognitive dysfunctions in de novo, drug-naïve PD patients. *J Neurol* 259: 1808-1813.

- Escalona, E., J. Leng, A. Dona, C. Merrifield, E. Holmes, C. Proudman, J. Swann (2014). Dominant components of the Thoroughbred metabolome characterised by ¹H-NMR spectroscopy: A metabolite atlas of common biofluids. *Equine Veterinary Journal* Aug 18: 2042-3306 doi: 10.1111/evj.12333.
- Estrada, C., Lopez, D., Conesa, A., Fernandez-Gomez, F. J., Gonzalez-Cuello, A., Toledo, F., . . . Herrero, M. T. (2015). Cognitive impairment after sleep deprivation rescued by transcranial magnetic stimulation application in octodon degus. *Neurotox Res*, 28(4), 361-371. doi: 10.1007/s12640-015-9544-x
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 1-14.
- Fifel, K.; Dkhisssi-Benyahya, O.; Cooper, H. M. Lack of long-term changes in circadian, locomotor, and cognitive functions in acute and chronic MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse models of Parkinson's disease. *Chronobiol Int*, v. 30, n. 6, p. 741-55, Jul 2013
- Galati, S., Salvade, A., Pace, M., Sarasso, S., Baracchi, F., Bassetti, C. L., . . . Moller, J. C. (2015). Evidence of an association between sleep and levodopa-induced dyskinesia in an animal model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 36(3), 1577-1589. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.018
- Gasser, T., Hardy, J., & Mizuno, Y. (2011). Milestones in PD genetics. *Mov Disord*, 26(6), 1042-1048. doi: 10.1002/mds.23637
- Gorell, J. M., Peterson, E. L., Rybicki, B. A., & Johnson, C. C. (2004). Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 217(2), 169-174.
- Graves, L., Pack, A., & Abel, T. (2001). Sleep and memory: a molecular perspective. *Trends Neurosci*, 24(4), 237-243.
- Gravotta, L., Gavrilu, A. M., Hood, S., & Amir, S. (2011). Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. *J Mol Neurosci*, 45(2), 162-171. doi: 10.1007/s12031-011-9520-8
- Guzman-Marin R, T. Bashir, N. Suntsova, R. Szymusiak, D. McGinty (2007). Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. *Neuroscience* (148): 325–33.
- Guzman-Marin, R., N. Suntsova, M. Methippara, R. Greiffenstein, R. Szymusiak, D. McGinty (2005). Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* (22):2111-6
- Hagewoud, R.; Havekes, R.; Novati, A.; Keijser, J. N.; Van der Zee, E. A.; Meerlo, P. (2010a). "Sleep deprivation impairs spatial working memory and reduces hippocampal AMPA receptor phosphorylation." *J Sleep Res* 19(2): 280-288.
- Hagewoud, R.; Whitcomb, S. N.; Heeringa, A. N.; Havekes, R.; Koolhaas, J. M.; Meerlo, P. (2010b). "A time for learning and a time for sleep: the effect of sleep deprivation on contextual fear conditioning at different times of the day." *Sleep* 33(10): 1315-1322.

- Hancock, D. B., Martin, E. R., Mayhew, G. M., Stajich, J. M., Jewett, R., Stacy, M. A., . . . Scott, W. K. (2008). Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol*, 8, 6. doi: 10.1186/1471-2377-8-6
- Hartmann, A., Veldhuis, J. D., Deuschle, M., Standhardt, H., & Heuser, I. (1997). Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging*, 18(3), 285-289.
- Hinard, V., C. Mikhail, S. Pradervand, T. Curie, R. H. Houtkooper, J. Auwerx, P. Franken, M. Tafti (2012). Key electrophysiological, molecular, and metabolic signatures of sleep and wakefulness revealed in primary cortical cultures. *J Neurosci*. Sep 5 32(36):12506-17.
- Hoglinger, G. U., Feger, J., Prigent, A., Michel, P. P., Parain, K., Champy, P., . . . Hirsch, E. C. (2003). Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem*, 84(3), 491-502.
- Ickenstein, G. W., Klotz, J. M., & Langohr, H. D. (1999). [Virus encephalitis with symptomatic Parkinson syndrome, diabetes insipidus and panhypopituitarism]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 67(10), 476-481. doi: 10.1055/s-2007-994998
- Iranzo, A. (2013). Parkinson disease and sleep: sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease; impaired olfaction and other prodromal features. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 13(9), 373. doi: 10.1007/s11910-013-0373-0
- Jacobs, B.L. and Fornal, C.A (1999).Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology*(21): 9S-15S.
- Jellinger, K. A. (2011). Neuropathology of Sporadic Parkinson's Disease: Evaluation and Changes of Concepts. *Movement Disorders*, 27(1): 1893–1907. doi:10.1100/2011/371893
- Jellinger, K. A. (2012). Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov Disord*, 27(1), 8-30. doi: 10.1002/mds.23795
- Kalaria, R. N., Maestre, G. E., Arizaga, R., Friedland, R. P., Galasko, D., Hall, K., ... Antuono, P. (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurology*, 7(9), 812–826. doi:10.1016/S1474-4422(08)70169-8
- Kandel, E.R.; J. H. Schwartz; T. M. Jessell (2003).In _____. *Princípios da Neurociência*. ed. São Paulo: Manole, 1227-1246.
- Kincheski, G. C., Valentim, I. S., Clarke, J. R., Cozachenko, D., Castelo-Branco, M. T. L., Ramos-Lobo, A. M., . . . Ferreira, S. T. (2017). Chronic sleep restriction promotes brain inflammation and synapse loss, and potentiates memory impairment induced by amyloid-beta oligomers in mice. *Brain Behav Immun*, 64, 140-151. doi: 10.1016/j.bbi.2017.04.007
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a008888.

- Lane, E., & Dunnett, S. (2008). Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: how close are we to the clinic? *Psychopharmacology (Berl)*, 199(3), 303-312. doi: 10.1007/s00213-007-0931-8
- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 339(15), 1044-1053. doi: 10.1056/NEJM199810083391506
- Langston, J. W., & Ballard, P. A., Jr. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*, 309(5), 310.
- Lees, A.J., N.A. Blackburn, V.L. Campbell (1988). The nighttime problems of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* (11): 512–519.
- Lena I., S. Parrot, O. Deschaux, S. Muffat-Joly, V. Sauvinet, B. Renaud, et al. (2005). Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep–wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J. Neurosci. Res.*(81), 891–899
- Lima, M. M. S., M. L. Andersen, A. B. Reksidler, M. A. B. F. Vital and S. Tufik (2007a). Effects of sleep deprivation on tyrosine hydroxylase expression and dopamine-related behaviors in two models of Parkinson's Disease. *Sleep Medicine* 8, Suppl 1: S103.
- Lima, M. M. S., M. L. Andersen, A. B. Reksidler, M. A. B. F. Vital and S. Tufik (2007b). The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE* 2: e513.
- Lima, M. M. S., M. L. Andersen, A. B. Reksidler, A. Silva, A. Zager, S. M. Zanata, M. A. Vital and S. Tufik (2008a). Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. *Behav Brain Res* 188(2): 406-11.
- Lima, M. M. S., A. B. Reksidler and M. A. B. F. Vital (2008b). The dopaminergic dilemma: Sleep or wake? Implications in Parkinson's disease. *Bioscience Hypothesis* 1: 9-13.
- Lima, M. M., A. B. Reksidler and M. A. Vital (2009). The neurobiology of the substantia nigra pars compacta: from motor to sleep regulation. *J Neural Transm Suppl*(73): 135-45.
- Lima, M. M. S., M. L. Andersen, A. B. Reksidler, A. C. Ferraz, A. M. Vital and S. Tufik (2012a). Paradoxical Sleep Deprivation Modulates Tyrosine Hydroxylase Expression in the Nigrostriatal Pathway and Attenuates Motor Deficits Induced by Dopaminergic Depletion. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.
- Lima, M. M. S., E. F. Martins, A. M. Delattre, M. B. Proenca, M. A. Mori, B. Carabelli and A. C. Ferraz (2012b). Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease - a Review of Clinical and Experimental Studies. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.
- Lima, M. M. (2013). Sleep disturbances in Parkinson's disease: the contribution of dopamine in REM sleep regulation. *Sleep Med Rev*, 17(5), 367-375. doi: 10.1016/j.smrv.2012.10.006
- Lin, C. H., Huang, J. Y., Ching, C. H., & Chuang, J. I. (2008). Melatonin reduces the neuronal loss, downregulation of dopamine transporter, and upregulation of D2 receptor in

- rotenone-induced parkinsonian rats. *J Pineal Res*, 44(2), 205-213. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00510.x
- Machado, R. B., D. Suchecki, S. Tufik (2005). Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behavioural brain research* 160 (2), 356-364
- Mapstone, M., A. K. Cheema, M. S. Fiandaca, X. Zhong, T. R. Mhyre, L. H. Macarthur, W. J. Hall, S. G. Fisher, D. R. Peterson, J. M. Haley, M. D. Nazar, S. A. Rich, D. J. Berlau, C. B. Peltz, M. T. Tan, C. H. Kawas, H. J. Federoff (2014). Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature medicine*.20(4):415-8. Epub 2014 Mar 09.
- Maturana, M. J. ; Pudell, C. ; Targa, A. D. ; Rodrigues, L. S. ; Nosedá, A. C. D. ; Fortes, M. H. ; Santos, P. ; Da Cunha ; Zanata Sm ; Ferraz, A. C. ; Lima, M. M. S (2014). REM Sleep Deprivation Reverses Neurochemical and Other Depressive-Like Alterations Induced by Olfactory Bulbectomy. *Molecular Neurobiology* (may 2014): 1-12.
- Meerlo, P., R. E. Mistlberger, B. L. Jacobs, H. C. Heller, and D. McGinty (2009). New neurons in the adult brain: The role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep Med Rev*. 13(3): 187–194.
- Meerlo, P.; de Bruin, E. A.; Strijkstra, A. M.; Daan, S.(2001). "A social conflict increases EEG slow-wave activity during subsequent sleep." *Physiol Behav* 73(3): 331-335.
- Mirescu, C, J. D. Peters, L. Noiman, E. Gould (2006). Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (103):19170–5.
- Mollenhauer, B., E. Trautmann, P. Taylor, P. Manninger, F. Sixel-Döring, J. Ebentheuer, C. Trenkwalder, M. G. Schlossmacher (2013). Total CSF α -Syn is lower in de novo Parkinson patients than in healthy subjects. *Neurosci. Lett.* (532), 44–48.
- Moore, S. J., Deshpande, K., Stinnett, G. S., Seasholtz, A. F., & Murphy, G. G. (2013). Conversion of short-term to long-term memory in the novel object recognition paradigm. *Neurobiol Learn Mem*, 105, 174-185. doi: 10.1016/j.nlm.2013.06.014
- Moreira, C. G., Barbiero, J. K., Ariza, D., Dombrowski, P. A., Sabioni, P., Bortolanza, M., . . . Lima, M. M. (2012). Behavioral, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration: a new approach for an old neurotoxin. *Neurotox Res*, 21(3), 291-301. doi: 10.1007/s12640-011-9278-3
- Nausieda, P. A., W.J. Weiner, L.R. Kaplan, S. Weber, H.L. Klawans (1982). Sleep disruption in the course of chronic levodopa therapy: an early feature of the levodopa psychosis. *ClinNeuropharmacol* (5): 183–194
- Neto, S. P., Carneiro, B. T., Valentinuzzi, V. S., & Araujo, J. F. (2008). Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light-dark cycle impairs passive avoidance but not object recognition memory in rats. *Physiol Behav*, 94(3), 523-527. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.03.013

- Nosedá, A. C., Rodrigues, L. S., Targa, A. D., Aurich, M. F., Vital, M. A., Da Cunha, C., & Lima, M. M. (2014). Putative role of monoamines in the antidepressant-like mechanism induced by striatal MT2 blockade. *Behav Brain Res*, 275, 136-145. doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.007
- Palchykova, S., Winsky-Sommerer, R., Meerlo, P., Durr, R., & Tobler, I. (2006). Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 85(3), 263-271. doi: 10.1016/j.nlm.2005.11.005
- Park, M., Comella, C. L., Leurgans, S. E., Fan, W., Wilson, R. S., & Bennett, D. A. (2006). Association of daytime napping and Parkinsonian signs in Alzheimer's disease. *Sleep Med*, 7(8), 614-618. doi: 10.1016/j.sleep.2006.02.006
- Pasupathy, A., & Miller, E. K. (2005). Different time courses of learning-related activity in the prefrontal cortex and striatum. *Nature*, 433(7028), 873-876. doi: 10.1038/nature03287
- Patti, C. L., Zanin, K. A., Sanday, L., Kameda, S. R., Fernandes-Santos, L., Fernandes, H. A., . . . Frussa-Filho, R. (2010). Effects of Sleep Deprivation on Memory in Mice: Role of State-Dependent Learning. *Sleep*, 33(12), 1669-1679.
- Perier, C., Bove, J., Vila, M., & Przedborski, S. (2003). The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 26(7), 345-346. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00144-9
- Porter, B., Macfarlane, R., & Walker, R. (2008). The frequency and nature of sleep disorders in a community-based population of patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 15(1), 50-54. doi: 10.1111/j.1468-1331.2007.01998.x
- Postle, B. R., Locascio, J. J., Corkin, S., & Growdon, J. H. (1997). The time course of spatial and object learning in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, 35(10), 1413-1422.
- Postuma, R. B., J. F. Gagnon, J. Montplaisir (2010). Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81:9 1008-1013. doi:10.1136/jnnp.2009.174748
- Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., & Priyadarshi, S. S. (2001). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*, 86(2), 122-127. doi: 10.1006/enrs.2001.4264
- Proenca, M. B., Dombrowski, P. A., Da Cunha, C., Fischer, L., Ferraz, A. C., & Lima, M. M. (2014). Dopaminergic D2 receptor is a key player in the substantia nigra pars compacta neuronal activation mediated by REM sleep deprivation. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, 118-126. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.024
- Pursiainen, V., Haapaniemi, T. H., Korpelainen, J. T., Huikuri, H. V., Sotaniemi, K. A., & Myllyla, V. V. (2002). Circadian heart rate variability in Parkinson's disease. *J Neurol*, 249(11), 1535-1540. doi: 10.1007/s00415-002-0884-0
- Ritz, B., & Yu, F. (2000). Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int J Epidemiol*, 29(2), 323-329.
- Rivkees, S. A., & Lachowicz, J. E. (1997). Functional D1 and D5 dopamine receptors are expressed in the suprachiasmatic, supraoptic, and paraventricular nuclei of primates. *Synapse*, 26(1), 1-10. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199705)26:1<1::AID-SYN1>3.0.CO;2-D

- Rodrigues, L. S., Targa, A., Nosedá, A. C. D., Aurich, M. F., Da Cunha, C., & Lima, M. M. S. (2014). Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. doi: 10.3389/fncel.2014.00383
- Roman, V., K. Van der Borght, S. Leemburg, E. A. Van der Zee, P. Meerlo (2005). Sleep restriction by forced activity reduces hippocampal cell proliferation. *Brain Res* (1065):53–9.
- Rothman, S. M., N. Herdener, K. A. Frankola, M. R. Mughal, M. P. Mattson (2013). Chronic mild sleep restriction accentuates contextual memory impairments, and accumulations of cortical A β and pTau in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 5(1529):200-8.
- Ruby, N. F., Fernandez, F., Garrett, A., Klima, J., Zhang, P., Sapolsky, R., & Heller, H. C. (2013). Spatial memory and long-term object recognition are impaired by circadian arrhythmia and restored by the GABA Antagonist pentylentetrazole. *PLoS ONE*, 8(8), e72433. doi: 10.1371/journal.pone.0072433
- Rye, D. B. (2004). "Parkinson's disease and RLS: the dopaminergic bridge." *Sleep Med* 5(3): 317-28.
- Santiago, R. M., Barbieiro, J., Lima, M. M., Dombrowski, P. A., Andreatini, R., & Vital, M. A. (2010). Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(6), 1104-1114. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.06.004
- Scherzer, C. R., Eklund, A. C., Morse, L. J., Liao, Z., Locascio, J. J., Fefer, D., ... Gullans, S. R. (2007). Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3): 955–960.
- Schuler, F., & Casida, J. E. (2001). The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci*, 57(10), 932-940. doi: 10.1002/ps.364
- Seugnet, L., Galvin, J. E., Suzuki, Y., Gottschalk, L., & Shaw, P. J. (2009). Persistent short-term memory defects following sleep deprivation in a drosophila model of Parkinson disease. *Sleep*, 32(8), 984-992.
- Sharma, S., Moon, C. S., Khogali, A., Haidous, A., Chabenne, A., Ojo, C., . . . Ebadi, M. (2013). Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). *Neurochem Int*, 63(3), 201-229. doi: 10.1016/j.neuint.2013.06.005
- Sherer, T. B., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. (2002). Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist*, 8(3), 192-197.
- Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., . . . Greenamyre, J. T. (2003). Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 23(34), 10756-10764.

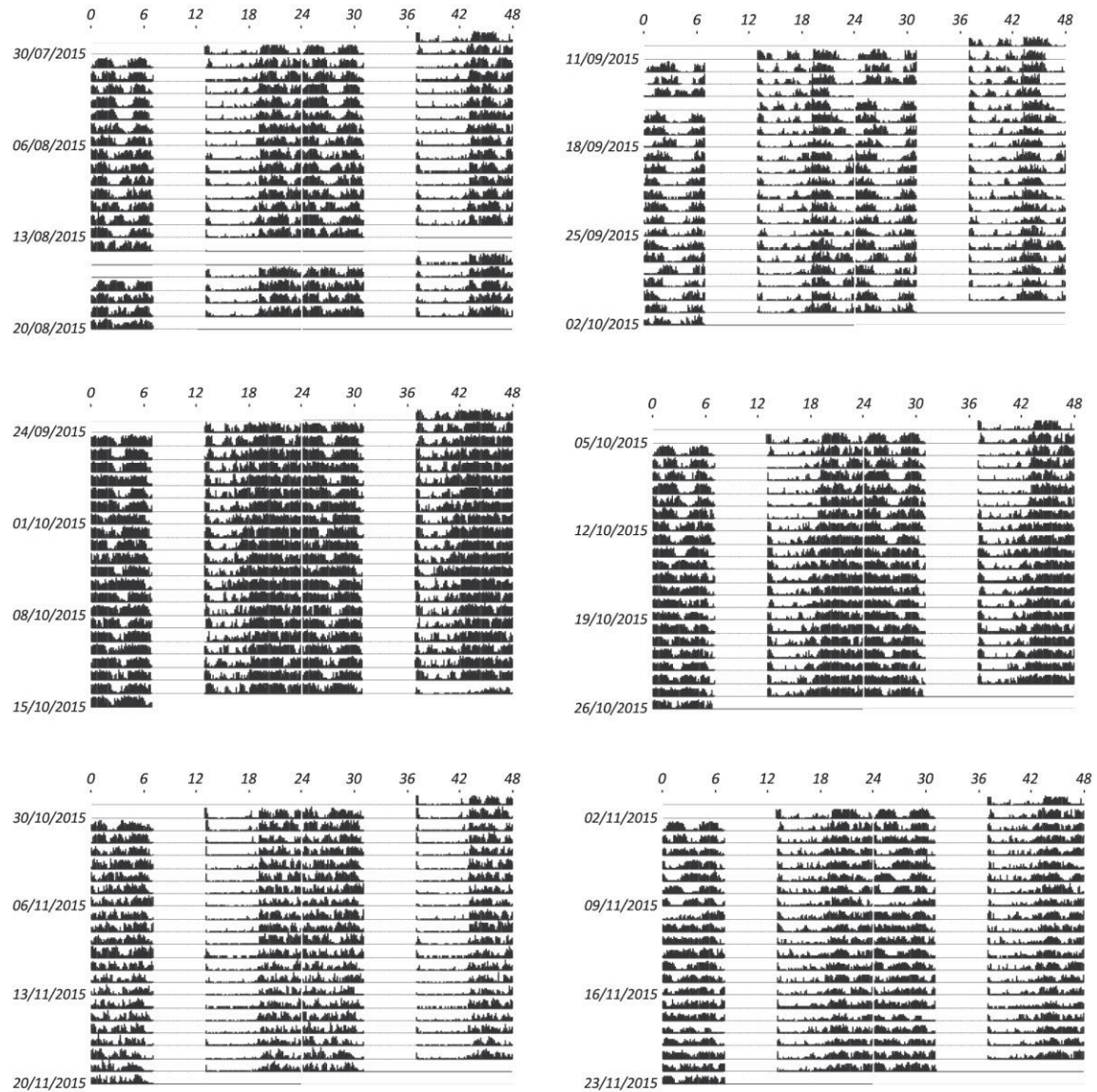
- Sleipness, E. P., B. A. Sorg and H. T. Jansen (2007). "Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus." *Brain Res* 1129(1): 34-42.
- Souchay, C., Isingrini, M., & Gil, R. (2006). Metamemory monitoring and Parkinson's disease. *J Clin Exp Neuropsychol*, 28(4), 618-630. doi: 10.1080/13803390590935453
- Sowers, J. R., & Vlachakis, N. (1984). Circadian variation in plasma dopamine levels in man. *J Endocrinol Invest*, 7(4), 341-345. doi: 10.1007/BF03351014
- Steckler, T., Drinkenburg, W. H., Sahgal, A., & Aggleton, J. P. (1998). Recognition memory in rats--II. Neuroanatomical substrates. *Prog Neurobiol*, 54(3), 313-332.
- Subramaniam, S. R., & Chesselet, M. F. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 106-107, 17-32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004
- Tandberg, E., J.P. Larsen, K. Karlsen (1998). A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, (13): 895-899.
- Taylor, S. R., Webb, A. B., Smith, K. S., Petzold, L. R., & Doyle, F. J., 3rd. (2010). Velocity response curves support the role of continuous entrainment in circadian clocks. *J Biol Rhythms*, 25(2), 138-149. doi: 10.1177/0748730409360949
- Tononi, G., & Cirelli, C. (2013). Perchance to prune. During sleep, the brain weakens the connections among nerve cells, apparently conserving energy and, paradoxically, aiding memory. *Sci Am*, 309(2), 34-39.
- Tononi, G., & Cirelli, C. (2014). Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*, 81(1), 12-34. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.025
- Tufik, S., Lindsey, C. J., & Carlini, E. A. (1978). Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology*, 16(2), 98-105.
- Tufik, S., Troncone, L. R., Braz, S., Silva-Filho, A. R., & Neumann, B. G. (1987). Does REM sleep deprivation induce subsensitivity of presynaptic dopamine or postsynaptic acetylcholine receptors in the rat brain? *Eur J Pharmacol*, 140(2), 215-219.
- Ueno, T., Tomita, J., Tanimoto, H., Endo, K., Ito, K., Kume, S., & Kume, K. (2012). Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. *Nat Neurosci*, 15(11), 1516-1523. doi: 10.1038/nn.3238
- Verbaan, D., van Rooden, S. M., Visser, M., Marinus, J., & van Hilten, J. J. (2008). Nighttime sleep problems and daytime sleepiness in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23(1), 35-41. doi: 10.1002/mds.21727
- Videnovic, A., & Golombek, D. (2013). Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 243, 45-56. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.08.018
- Videnovic, A., Lazar, A. S., Barker, R. A., & Overeem, S. (2014). 'The clocks that time us'--circadian rhythms in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 10(12), 683-693. doi: 10.1038/nrneurol.2014.206

- Videnovic, A., Noble, C., Reid, K. J., Peng, J., Turek, F. W., Marconi, A., . . . Zee, P. C. (2014). Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson disease. *JAMA Neurol*, 71(4), 463-469. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.6239
- Webb, I. C., Patton, D. F., Landry, G. J., & Mistlberger, R. E. (2010). Circadian clock resetting by behavioral arousal: neural correlates in the midbrain raphe nuclei and locus coeruleus. *Neuroscience*, 166(3), 739-751. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.014>
- Weber, M., T. Lauterburg, I. Tobler and J. M. Burgunder (2004). "Circadian patterns of neurotransmitter related gene expression in motor regions of the rat brain." *Neurosci Lett* 358(1): 17-20.
- Wegelin, J., McNamara, P., Durso, R., Brown, A., & McLaren, D. (2005). Correlates of excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 11(7), 441-448. doi: 10.1016/j.parkreldis.2005.05.007
- Whittaker, J., T. Morcol and J. Patrickson (1997). "Circadian plasticity in dopaminergic parameters in the rat substantia nigra." *Soc Neurosci* 80 190-195.
- Willison, L. D., Kudo, T., Loh, D. H., Kuljis, D., & Colwell, C. S. (2013). Circadian dysfunction may be a key component of the non-motor symptoms of Parkinson's disease: insights from a transgenic mouse model. *Exp Neurol*, 243, 57-66. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.01.014
- Wisor, J. P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G. H., Mignot, E., & Edgar, D. M. (2001). Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci*, 21(5), 1787-1794.
- World Health Organization - WHO.(2012). Life Expectancy – Data by Country. Acessado em 7 de novembro de 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.680?lang=en>

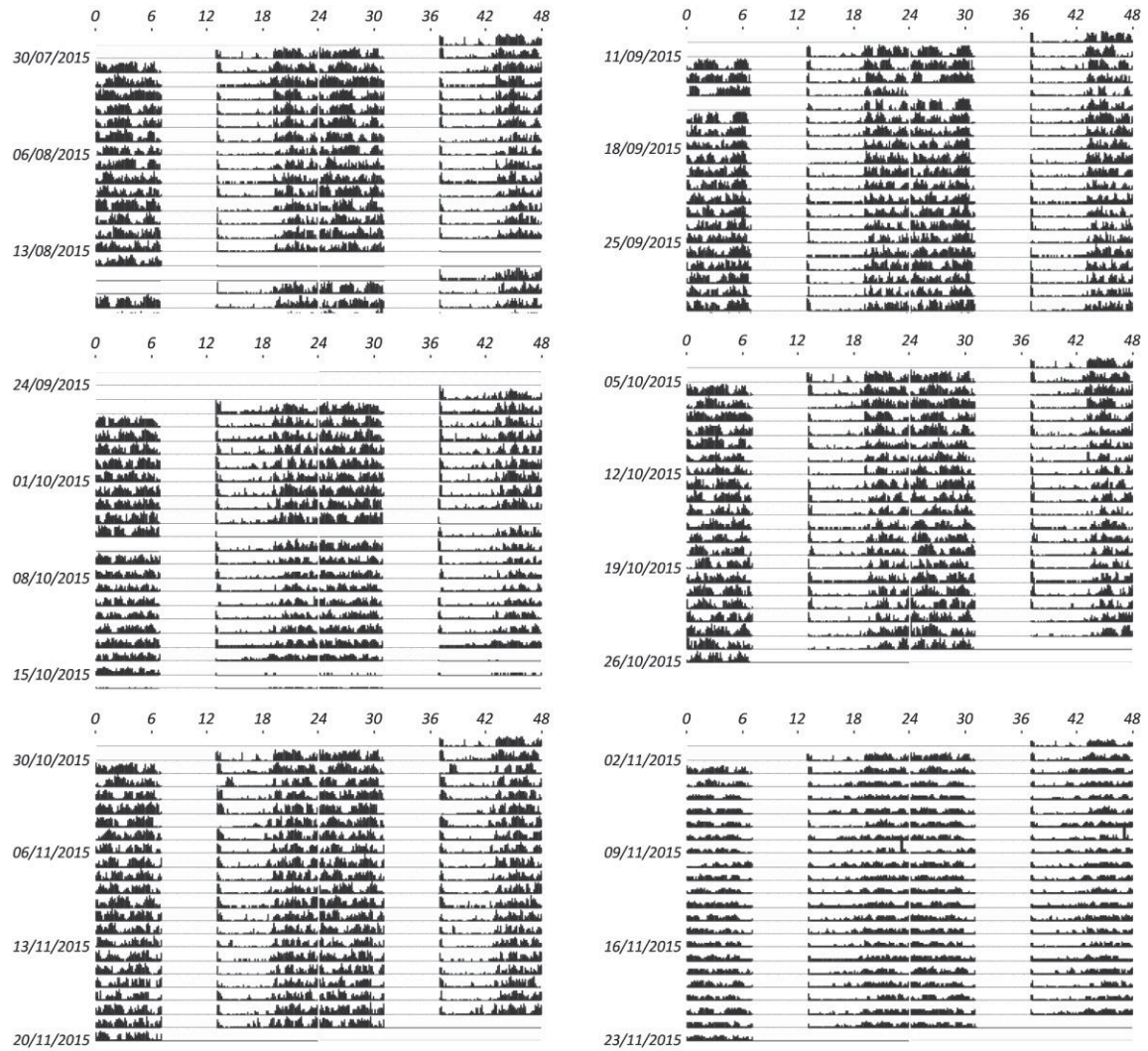
ANEXOS

ANEXO I - ACTOGRAMAS

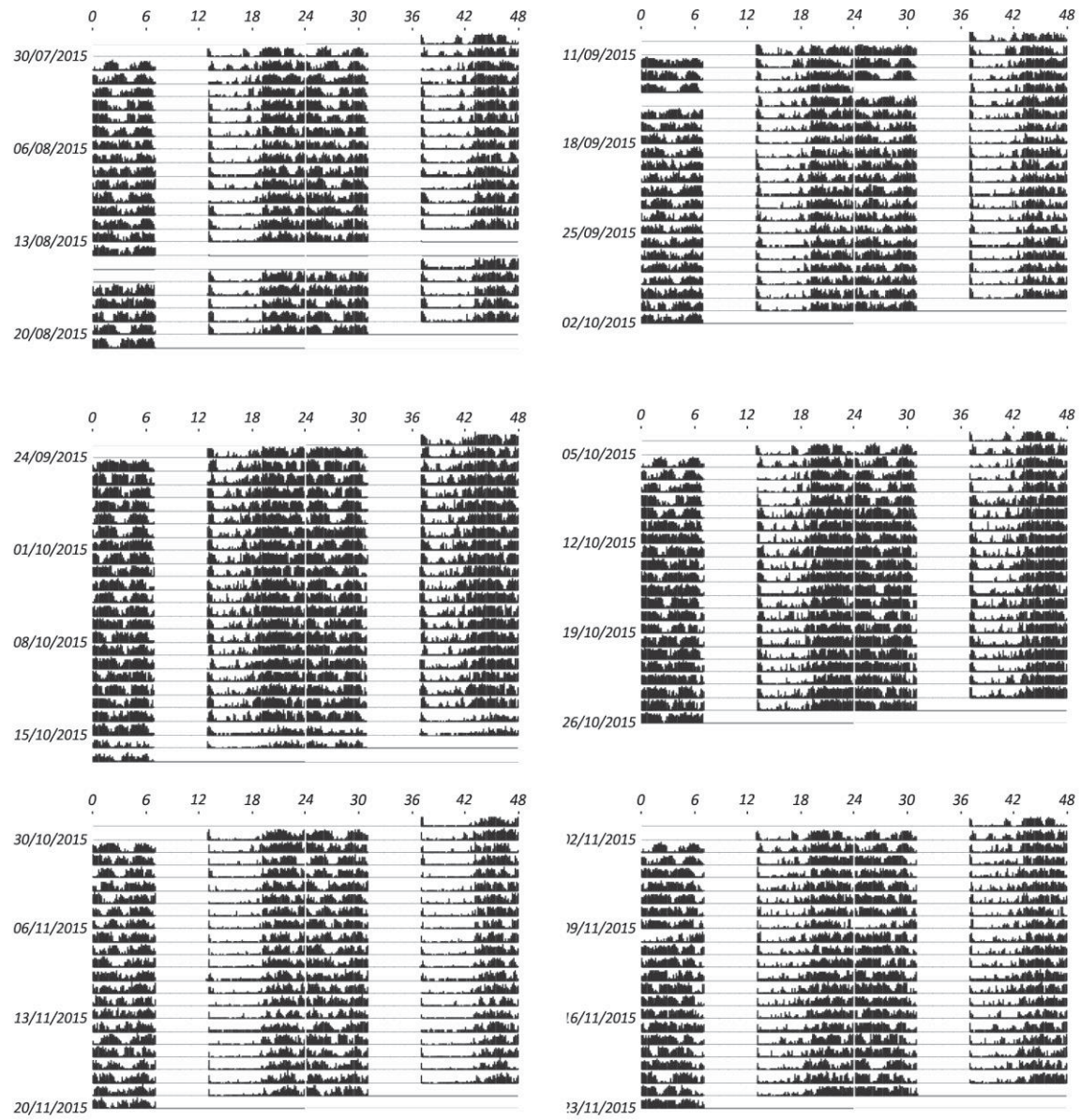
ROTENONA CT



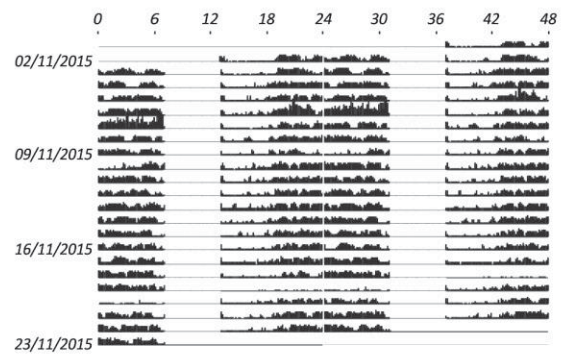
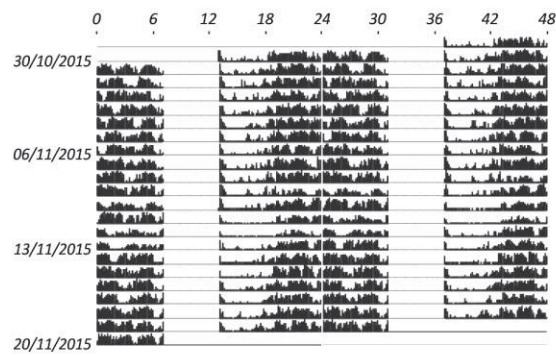
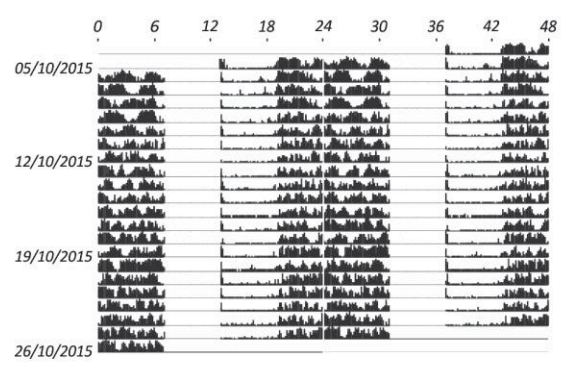
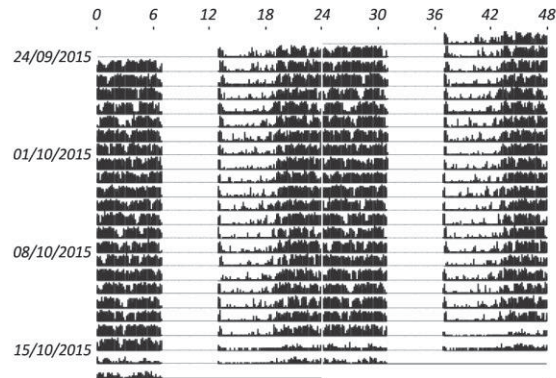
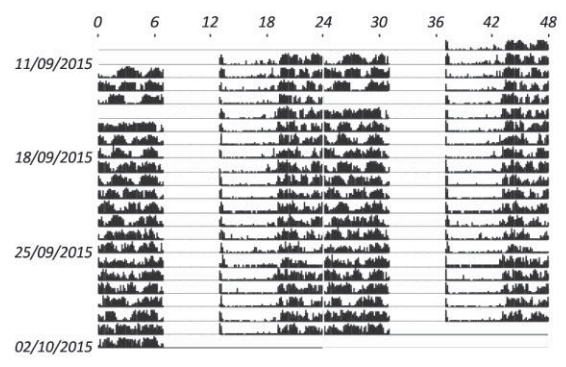
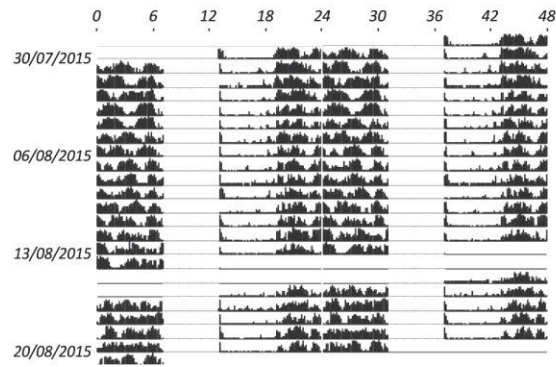
ROTENONA SD



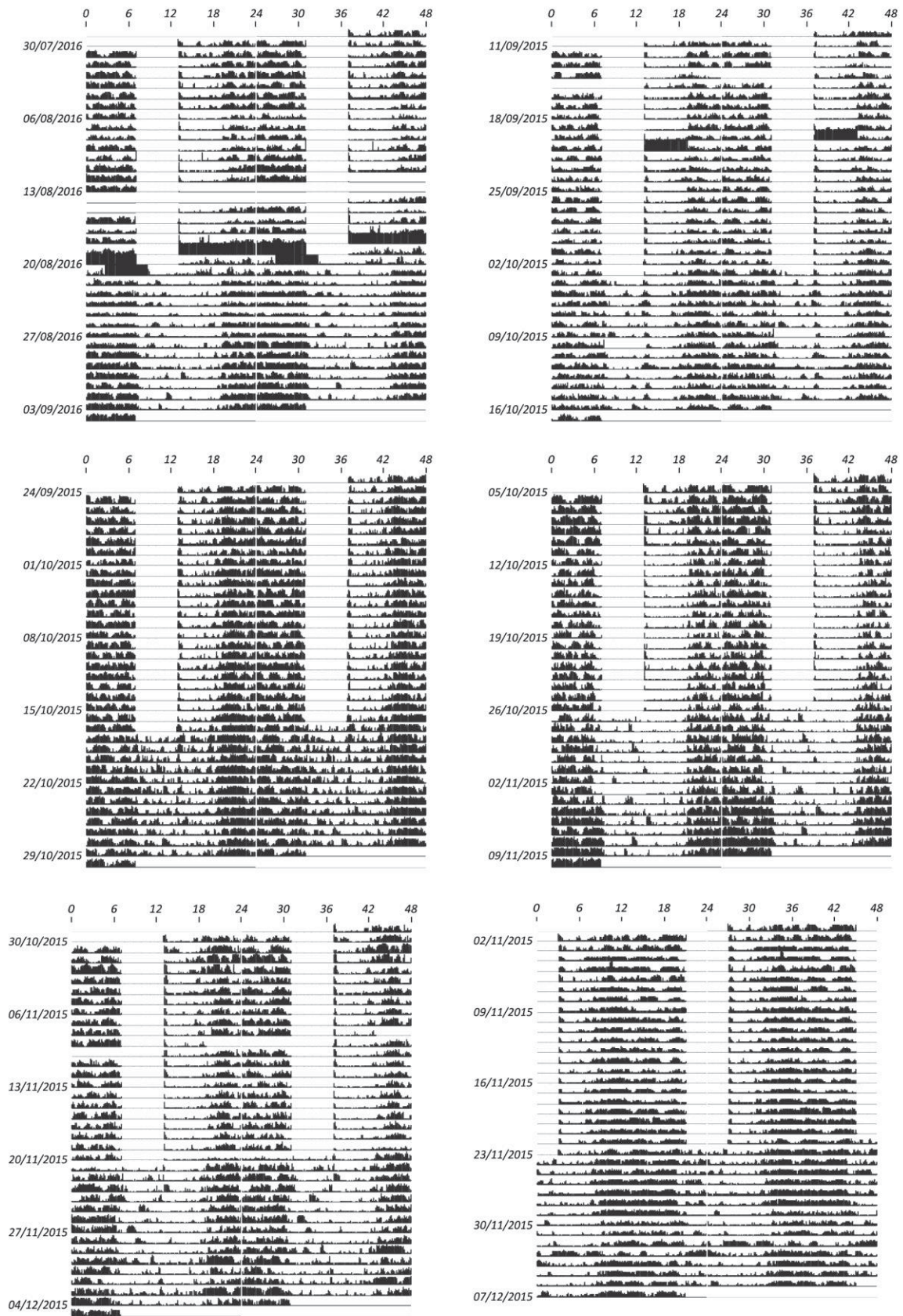
SHAM CT



SHAM SD



ROTENONA REB



SHAM REB

	0	6	12	18	24	30	36	42	48
11/09/2015									
18/09/2015									
25/09/2015									
02/10/2015									
09/10/2015									
16/10/2015									

Figure 1 displays a grid of 120 small plots arranged in 6 rows and 20 columns. The rows represent dates from 24/09/2015 to 29/10/2015. The columns represent values of x (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48). Each plot shows the probability distribution $P(x)$ for a specific date and x value. The distributions are generally centered around x and become more spread out as time progresses. The x-axis for each plot is labeled with the corresponding x value, and the y-axis is labeled with the probability $P(x)$.

0 6 12 18 24 30 36 42 48

30/10/2015

06/11/2015

13/11/2015

20/11/2015

27/11/2015

04/12/2015

[illegible]

ANEXO II - MODELO DO PERFIL DIÁRIO DE ATIVIDADE



ANEXO III – TABELA DE VALORES DE ATIVIDADE

Valores tabulados das diferenças estatísticas no tempo de atividade a cada 5 minutos entre os grupos sham e rotenona ao longo de 24 horas durante o período rebote.

Tempo (min)	s	p	Tempo (min)	s	p	Tempo (min)	s	p
0	*	< 0,0001	670	*	< 0,0001	1250	*	< 0,0001
5	*	< 0,0001	675	*	< 0,0001	1255	*	< 0,0001
10	*	< 0,0001	680	*	< 0,0001	1260	*	0,000225
15	*	< 0,0001	685	*	< 0,0001	1270	*	< 0,0001
20	*	< 0,0001	690	*	< 0,0001	1275	*	< 0,0001
25	*	0,000212	695	*	< 0,0001	1280	*	< 0,0001
435	*	< 0,0001	700	*	< 0,0001	1285	*	< 0,0001
440	*	< 0,0001	705	*	< 0,0001	1290	*	< 0,0001
445	*	< 0,0001	710	*	< 0,0001	1295	*	< 0,0001
450	*	< 0,0001	725	*	< 0,0001	1300	*	< 0,0001
455	*	< 0,0001	730	*	< 0,0001	1310	*	< 0,0001
465	*	< 0,0001	735	*	< 0,0001	1315	*	< 0,0001
475	*	< 0,0001	740	*	< 0,0001	1320	*	< 0,0001
480	*	< 0,0001	745	*	< 0,0001	1325	*	< 0,0001
485	*	< 0,0001	750	*	< 0,0001	1330	*	< 0,0001
490	*	< 0,0001	755	*	< 0,0001	1335	*	< 0,0001
495	*	< 0,0001	785	*	0,000241	1340	*	< 0,0001
500	*	< 0,0001	1145	*	< 0,0001	1345	*	< 0,0001
510	*	< 0,0001	1150	*	< 0,0001	1350	*	< 0,0001
520	*	< 0,0001	1155	*	< 0,0001	1355	*	< 0,0001
525	*	< 0,0001	1160	*	< 0,0001	1360	*	< 0,0001
530	*	< 0,0001	1165	*	< 0,0001	1365	*	< 0,0001
535	*	< 0,0001	1170	*	< 0,0001	1370	*	< 0,0001
540	*	< 0,0001	1175	*	< 0,0001	1375	*	< 0,0001
545	*	< 0,0001	1180	*	0,000247	1380	*	< 0,0001
550	*	< 0,0001	1190	*	0,000254	1385	*	< 0,0001
560	*	0,000194	1200	*	0,000141	1390	*	< 0,0001
580	*	0,000233	1205	*	< 0,0001	1395	*	< 0,0001
625	*	< 0,0001	1210	*	< 0,0001	1400	*	< 0,0001
630	*	< 0,0001	1215	*	< 0,0001	1405	*	< 0,0001
635	*	< 0,0001	1220	*	< 0,0001	1410	*	< 0,0001
640	*	< 0,0001	1225	*	< 0,0001	1415	*	< 0,0001
645	*	< 0,0001	1230	*	< 0,0001	1420	*	< 0,0001
650	*	< 0,0001	1235	*	< 0,0001	1425	*	< 0,0001
660	*	0,000143	1240	*	< 0,0001	1430	*	< 0,0001
665	*	< 0,0001	1245	*	< 0,0001	1435	*	< 0,0001

Diferença estatística determinada utilizando o método Holm-Sidak, com $\alpha=5$. $n=24$ (6 x 4)/grupo. S = significante.